

Über glatte Muskulatur erregende Substanzen
aus Blut unter besonderer Berücksichtigung
des Kallikrein-Kallidin-Systems

von

FRITZ PREISSER

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität M ü n c h e n .

Direktor (Vorstand): Prof. Dr. E. K. Frey.

Titel der Arbeit.

Über glatte Muskulatur erregende Substanzen
aus Blut unter besonderer Berücksichtigung des
Kallikrein-Kallidin-Systems.



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Fritz Preisser

aus

München

1957

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof Dr. Dr. E. Werle

Gegenreferent: Prof. Dr. E. K. Frey

Dekan: Prof. Dr. Büngeler

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Oktober 1957

Inhaltsverzeichnis

Seite

I) Kallikrein, sein Vorkommen und seine Bedeutung im Organismus der Säugetiere und des Menschen	1
A) Einführung Allgemeines	1
B) Das Vorkommen und Verteilung von Kallikrein im Organismus der Säugetiere	3
C) Mögliche Aufgaben von Kallikrein im Organismus	4
a) Wirkung von Kallikrein, wie sie nach i.v. oder i.m. Verabreichung am Organismus zu beobachten ist.	4
1) Sofortwirkungen von Kallikrein am Organismus.	4
2) Spätwirkungen von Kallikrein, wie sie besonders während längerdauernder Verabreichung am Menschen und am Versuchstier zu beobachten sind.	7
3) Kallikrein in seinen Zusammenhängen mit Sympathicomimetica, Sympathicolytica, Parasympathicomimetica und Parasympathicolytica.	10
4) Zusammenfassung	11
II) Kallidin	13
A) Einführung	13
a) Zur Technik der Testung die glatte Muskulatur erregender Substanzen am biologischen Testobjekt.	13
b) Untersuchung und Darstellung der im Serum bei der Kallidinfreilegung ablaufenden Reaktionsvorgänge	16
1) Aktivierung von Kallidinogen zu Kallidin	17
2) Inaktivierung des gebildeten Kallidins	17
3) Inaktivierung des Kallikreins durch Serum	19

B) Isolierung und Anreicherung der einzelnen an der Kallidinfreilegung beteiligten Reaktionskomponenten	21
a) Gewinnung der inaktiven Vorstufe von Kallidin, dem Kallidinogen aus Serum	21
1) Definition	21
2) Vorkommen von Kallidinogen im Organismus	21
3) Versuche, Kallidinogen durch spezifische Adsorption aus Serum anzureichern und zu isolieren	22
d) Adsorption von Kallidinogen an Aluminiumoxyd	22
B) Gewinnung von Kallidinogen durch Fraktionierung von Serum an der Aluminiumoxyd-Säule	22
γ) Adsorption von Kallidinogen an Fullererde	23
δ) Adsorption von Kallidinogen an Permutit	24
ε) Adsorption von Kallidinogen an Bleichererde	24
4) Versuche, Kallidinogen durch fraktionierte Fällung des Serums anzureichern und zu isolieren	25
d) Fällung von Serum mit Casein	25
B) Fällung von Serum mit Ammonsulfat	28
γ) Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	30
b) Anreicherung und Isolierung von Kallidin	32
1) Eigenschaften und Vorkommen von Kallidin im Organismus	32
2) Möglichkeiten und Wege der Kallidin-Darstellung	33
a) Anreicherung und Isolierung von Kallidin aus einem Serum-Kallikrein-Inkubate	34
γ) Gewinnung von Kallidin durch Dialyse des Inkubationsgemisches und Weiterverarbeitung des Aussendialysates	38

α_1)	Papierchromatographische Untersuchung des gewonnenen Kallidinpräparates	37
α_2)	Weitere Anreicherung der gewonnenen Kallidin-Lösung durch die Gegenstromverteilung	38
β)	Vor- und Nachteile der Dialysiermethode. Diskussion weiterer Möglichkeiten der Kallidin-Gewinnung	41
γ)	Isolierung von Kallidin aus einem Kallikrein-Serum an Tierkohle	44
γ_1)	Ohne Cysteinschutz	44
γ_2)	Mit Cysteinschutz	46
γ_3)	Rückgewinnung des an die Kohle adsorbierten Kallidins durch Elution des Niederschlages mit Aqua dest.	46
γ_4)	Rückgewinnung des an die Kohle adsorbierten Kallidins durch Elution mit Methanol bei Zusatz von 1% Trichloressigsäure	47
γ_5)	Abgrenzung der gewonnenen Kallidin-Lösung gegenüber anderen darmaktiven Substanzen des Serums	49
γ_6)	Papierchromatographische Untersuchung des gewonnenen Präparates und weitere Reinigung der Lösung	50
δ)	Isolierung und Anreicherung von Kallidin aus dem Kallikrein-Serum-Inkubat durch Fraktionierung an einer Aluminiumoxydsäule	51
b)	Gewinnung von Kallidin durch Anreicherung aus einem Kallidinogen-Kallikrein-Inkubat	53
δ)	Fraktionierung des Kallidinogen-Kallikrein-Inkubates an der Amberlite IR4-B-Säule mit Weiterfraktionierung der kallidinhaltigen Fraktionen an einer Amberlite IRC-50-Säule	54
β)	Fraktionierung eines Kallidinogen-Kallikrein-Inkubates an der Amberlite IRC-50-Säule	57

c) Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse . . .	60
III) Untersuchung der durch nicht enzymatisch wirksame Substanzen im Serum, Plasma oder einer Pseudo- globulinfraktion auslösbaren Reaktionen	62
A ₁) Untersuchungen der im Serum, Plasma oder einer Pseudoglobulinfraktion durch Hitze bei Zusatz von 50 Vol.-% in H ₂ SO ₄ oder in NaOH freigelegten darmaktiven Substanzen	63
2) Pharmakologische und chemische Eigenschaften der durch Säure oder Laugendenaturierung von Serum gewonnenen darmaktiven Substanzen	64
3) Diskussion der Ergebnisse	65
B ₁) Untersuchung der im Serum nach Hitzedenaturierung bei Zusatz von 10 Vol.-% in H ₂ SO ₄ ablaufenden Reak- tionsvorgänge	66
a) Aktivierung eines Proaktivators	
b) Aktivierung der Vorstufe der darmaktiven Substanz	
c) Inaktivierung der darmaktiven Substanz	
d) Schematische Darstellung dieser Reaktionsvorgänge . .	68
2) Chemische und pharmakologische Eigenschaften der durch Hitze + H ₂ SO ₄ im Serum freigesetzten darm- aktiven Verbindungen	70

3) Untersuchung des nach der Deanturierung des Serums verbliebenen Rückstandes	71
a) Einfluß der Wasserdampfdennaturierung auf die Aktivitätsausbeute	73
b) Einfluß der Dauer der Erhitzung auf die Höhe der aktivierbaren Substanzmenge	74
c) Abhängigkeit der Aktivitätsausbeute vom p_H des Inkubationsgemisches	74
C ₁) Eigenschaften der durch bloße Hitzedenaturierung im Serum freigesetzten darmaktiven Verbindungen . . .	77
2) Untersuchung des nach der Hitzedenaturierung des Serums abzentrifugierten Niederschlages	79
D) Untersuchung der durch Zugabe von Äthanol im Serum oder einer Pseudoglobulinfraktion auslös- baren Reaktionen	85
1) Untersuchung der durch Hitze + Äthanol in einer Pseudoglobulinfraktion aktivierten enzymatisch wirksamen Substanz	85
2) Wirkung der gewonnenen Überstände am biologischen Testobjekt	85
3) "Enzymatische" Aktivität der Lösung	86
E) Untersuchung der im Serum oder einer Pseudoglobulin- fraktion durch Zugabe von Äthanol auslösbaren Reaktionen	87

1) Aktivität der gewonnenen Eluate am biologischen Testobjekt	88
2) Pharmakologische und chemische Eigenschaften der durch Äthanoletelution aus Serum gewonnenen darmaktiven Substanzen	89
3) Reinigung und weitere Anreicherung der durch Äthanoletelution aus Serum freigelegten darmaktiven Substanzen	90
4) Elution des abzentrifugierten Überstandes mit Äthanol	90
5) Gewinnung einer darmaktiven Substanz aus dem nach der Äthanol fällung des Serums verbliebenen Niederschlages durch Elution mit Aceton	92
6) Aktivatorwirkung der durch Äthanoletelution aus Serum gewonnenen darmaktiven Lösung	94
7) Schematische Darstellung der durch Äthanol fällung im Serum oder Plasma auslösbaeren Reaktionen	95
8) Untersuchung der inaktiven Vorstufe im Serum	96
9) Untersuchung der aktiven Substanz	96
10 Untersuchung des Inaktivators im Serum	97
11) Zusammenfassung	97
F) Gesamtzusammenfassung	101
Literaturangaben	109

Die vorliegende Arbeit wurde im wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik zu München in der Zeit vom März 1954 bis Juni 1957 ausgeführt.

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle

meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. E. K. Frey darf ich an dieser Stelle danken für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes im Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik.

I. Kallikrein, sein Vorkommen und seine Bedeutung
im Organismus der Säugetiere und des Menschen.

A) Einführung.

Kallikrein (K) ist eine 1928 von Frey und Kraut im Urin und später auch im Pankreas, im Pankreassaft, in den Speicheldrüsen, im Speichel sowie im Blut und Kot nachgewiesene Substanz, die durch den sogen. Inaktivator, der in Blutserum und Extrakten aus bestimmten Organen von Wiederkäuern vorkommt, reversibel inaktiviert wird. K vermag den Blutdruck kurzdauernd zu senken sowie aus Serum eine blutdrucksenkende, darm- und uterusaktive Substanz, Kallidin genannt, freizulegen. Bei dem derzeitigen Stand der Reinigung gilt K als eine hochmolekulare thermolabile, stark säure- und laugenempfindliche Verbindung.

Ihr Vorkommen sowie ihre physiologische Wirkungsweise im Organismus lassen eine hormonelle Funktion vermuten. Andererseits weist K, wie schon angedeutet, gegenüber bestimmten Proteinen des Serums eine

proteolytische Fähigkeit auf, weshalb es auch als Ferment bezeichnet werden könnte.

Es wäre naheliegend, diese Mehrfachwirkung mit der eventuellen pharmakologischen Wirkung irgendwelcher Begleitsubstanzen der bis jetzt noch nicht in Substanz vorliegenden K-Präparate zu erklären. Dem steht jedoch entgegen, daß es durch keine biologische oder chemische Maßnahme bisher gelungen ist, die beiden Grundeigenschaften von K, seine blutdrucksenkende und seine proteolytische Fähigkeit voneinander zu trennen. Im übrigen scheinen die in den einzelnen K-Präparaten vorhandenen Begleitsubstanzen die Wirkung von K nicht wesentlich zu beeinflussen, da Präparate mit 1-10mg/Einheit K (KE) im wesentlichen dasselbe pharmakologische Wirkungsspektrum aufweisen, wie Präparate mit nur 10-40 /KE. Trotz dieser pharmakologischen Einheitlichkeit weichen die physikochemischen Eigenschaften der K verschiedener Herkunft deutlich voneinander ab. So ist ihre Zerstörbarkeit durch Hitze, Säure oder Lauge und auch ihre Inaktivierbarkeit durch Leber, Ohrspeicheldrüsen oder Kartoffelinaktivator nicht gleich. Beispielsweise ist Submaxillaris-K gegenüber Säure bedeutend stabiler als K aus Pankreas oder Blut.

B) Das Vorkommen und die Verteilung von Kallikrein im Organismus der Säugetiere.

Die Verteilung von K innerhalb der Säugetiereihe sowie innerhalb eines Organismus zeigt Tab. 1. Wie daraus ersichtlich enthalten Organe der Fleischfresser im allgemeinen mehr K als Pflanzenfresser, obwohl auch bei diesen K nicht fehlt. Zur Methode der Isolierung und des Nachweises von K darf auf E.K. Frey, H. Kraut und E. Werle "Kallikrein" (Padutin) Ferdinand Enke Verlag 1950 verwiesen werden.

Anm. Als eine Einheit (1 KE) wird die Menge an blutdrucksenkender Substanz bezeichnet, die in 1 ml dialysierten, normalem menschlichen Sammelurin nachweisbar ist.

Tab. 1 Verteilung und Vorkommen von Kalikrein im Organismus der Säuertiere.

Die Angaben bezeichnen Einheiten an Kalikrein pro σ Drüsengewebe bzw pro σ Flüssigkeit.

Organe							
	Pankreas	Speicheldrüsen			Blut	Harn	Gesamtgehalt eines Organismus an K.
		Sublingual.	Submaxill.	Parotis			
Mensch	5	1,43	1,73	0,38	2,5	0,2	10000-15000
Schwein	20 - 30	0,57	27	0	2,0	0,2	15000 - 20000
Hund	10 - 15	0,38	4,62	1,68	0,2	0,5	3000 - 5000
Rind	4 - 8	0,56	15	0	0,1	0,12	4000 - 6000
Pferd	0,5 - 1	0	0	0	0,5	0,01	3000 - 5000
Schaf	10						

C) Mögliche physiologische Aufgaben von Kallikrein im Organismus.

a) Wirkung von Kallikrein, wie sie nach i.v. oder i.m. Verabreichung am Organismus zu beobachten ist.

Von den Wirkungen, wie sie nach i.v. oder i.m. Zufuhr von K am Organismus auftreten, lassen sich etwa zwei Formen unterscheiden. Die erste stellt Wirkungen dar, die unmittelbar nach Injektion von K am Versuchstier oder auch am Menschen auftreten, während die zweite Form eine Reihe von Wirkungen einschließt, wie sie erst nach längerdauernder Verabreichung von K zu beobachten sind.

1) Sofortwirkungen von Kallikrein am Organismus.

Wird K einem Organismus, z.B. einem narkotisierten Versuchstier oder auch einem nichtnarkotisierten Tier oder Menschen in Dosen von 0,1 - 0,3 KE i.v. injiziert, so kommt es zu einem momentanen steilen Abfall des allgemeinen Blutdruckes um 10-20 mm Hg. Innerhalb von 2-3 Minuten kehrt der Blutdruck wieder in seine Ausgangslage zurück. Der Verlauf einer typischen K-Wirkung weist etwa die Form eines rechtwinkligen oder gleichschenkligen Dreiecks auf, wo-

bei der tiefste Punkt des Blutdruckabfalls etwa dem rechten Winkel dieses Dreiecks entspricht. Die Stärke und die Dauer der Blutdrucksenkung ist abhängig einmal von der verabreichten K-Menge und zum anderen von der Empfindlichkeit des Versuchstieres für K. Dabei steigt die Höhe des Blutdruckabfalls nicht linear mit der injizierten K-Menge, sondern fällt nur etwa logarithmisch ab. Dies bedeutet, daß ein vollständiges Absinken des Blutdruckes bis zu seinem Nullpunkt durch K nur bei Verabreichung sehr hoher Dosen 100-200 KE zu erreichen ist. K unterscheidet sich dadurch deutlich von anderen blutdruckaktiven Substanzen, wie z.B. Histamin oder Acetylcholin. Offenbar wird durch die im Blut vorhandenen Inaktivatoren von K in weit stärkerem Maße als bei den übrigen Substanzen einem zu starken und schnellen Wirksamwerden von K entgegengewirkt. Versuchstiere, denen sehr hohe Dosen (100-200 KE) rasch i.v. injiziert worden waren, kamen meist innerhalb der nächsten ein bis zwei Tage unter starken Schockerscheinungen ad exitum.

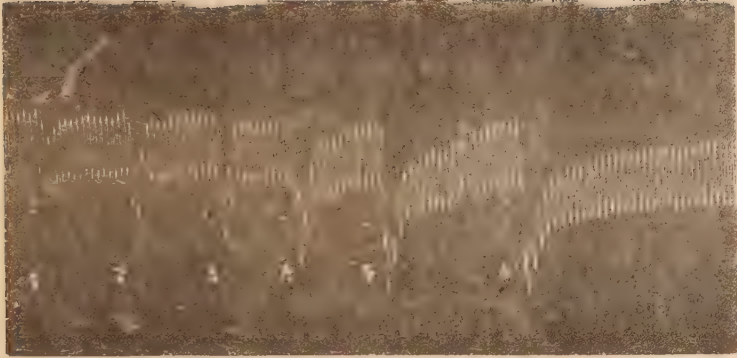


Abb:3

Hund in Morphin-Pernocton Narkose. (15 kg männl.)
Direkte Blutdruckmessung mit einem an die A.Carotis
angeschlossenen Ludwig'schen Quecksilbermanometer.
Blutdruckwerte während der Messung 100/85.

Die Abb. zeigt die Blutdruckwirkung steigender K
Dosen.

1., 0,1 KE
4., 0,6 KE

2., 0,2 KE
5., 1,0 KE

3., 0,3 KE
6., 1,7 KE

2) Spätwirkungen von Kallikrein, wie sie besonders
während längerdauernder Verabreichung am Menschen
und am Versuchstier zu beobachten sind.

Nach längerdauernder Verabreichung von K ist eine allmähliche Desensibilisierung des Versuchstieres gegenüber K festzustellen. Dies ist besonders deutlich, wenn rasch hintereinander höhere Dosen von K gegeben werden. Der Grund dieser allmählichen Desensibilisierung ist in allen seinen Einzelheiten bis jetzt nicht bekannt. Auffallend ist jedoch die der Desensibilisierung parallel gehende Abnahme eines im Serum nachweisbaren spezifischen Substrates von K, dem Kallidinogen. Kallidinogen, ein hochmolekularer Eiweißkörper ist in der α -2-Globulinfraktion des Serums nachweisbar. Bei Inkubation mit K wird aus ihm ein Polypeptid abgespalten, Kallidin genannt, das seinerseits den Blutdruck ebenso wie K zu senken vermag, sowie Darm- und Uterus-erregende Eigenschaften aufweist. Die i.v. Verabreichung von K führt ebenfalls zur Entstehung von DK in der Blutbahn, wie durch Entnahme entsprechender Blutproben nach der K-Injektion festgestellt wurde. Ob die Senkung des

Blutdruckes nach Injektion von K auf dieser Freisetzung von Kallidin beruht, ist nicht sicher zu entscheiden. Die der injizierten K-Menge parallel verlaufende Abnahme des Kallidinogenspiegels im Serum in vivo und in vitro sowie die Desensibilisierbarkeit eines Organismus gegenüber K, der in der Erschöpfung des Kallidinogendepots begründet sein dürfte, würden für einen derartigen Wirkungsmechanismus von K sprechen.

Die Senkung des allgemeinen Blutdrucks nach Injektion von K ist in der Hauptsache auf die Eröffnung präcapillärer und capillärer Gefäßabschnitte zurückzuführen. Dieser allgemeinen Dezentralisation des Kreislaufs zufolge ist einerseits die Erhöhung der Hauttemperatur und andererseits die momentan verminderte Durchblutung der Eingeweide sowie der Leber und der Nieren festzustellen. Weiterhin führt K zu vermehrter und auch verstärkter Herzaktion, besserer Durchblutung der Coronarien sowie einer Vermehrung der Durchblutung des Gehirns. Im Zusammenhang mit dieser spasmolytischen Wirkung lassen sich auch die günstigen

therapeutischen Erfolge der K- (Padutin)-Behandlung bei Formen peripherer Durchblutungsstörungen verstehen. (E.K. Frey, W. Hartenbach, F. Schultz; *Wirkstoffe Med. Wschr.* 95 1 11-15 1953. E. K. Frey, W. Hartenbach; *Dtsch. Med. Wschr.* 78 1 5-8 1953.

weitere, in vielfältigen und unterschiedlichen Zusammenhang mit dem KE-Wirkungsmechanismus stehende Funktionen stellen die zu beobachtende Stoffwechselsteigerung, die Erhöhung des Grundumsatzes, die Gewichtszunahme, die Anregung der Knochenmarkstätigkeit sowie die Anregung allgemeiner Wachstumsvorgänge - Jensen Sarkome wurden durch KE in ihrem Wachstum beschleunigt - dar. Es sind dies Wirkungen von K, deren Analyse infolge ihres tiefen Eingreifens in das allgemeine Stoffwechselgeschehen eines Organismus zu kompliziert erscheint, um daraus wesentliche Funktionen von K ableiten zu können.

Eine Funktion von K, die spezifischer Natur zu sein scheint, ist ein Antagonismus gegenüber Adrenalin.

Adrenalin hemmt in vivo wie auch in vitro die Wirkungen von K. Wie schon erwähnt, vermag K den isolier-

ten Hunde- oder Katzendarm zur Kontraktion zu erzeugen, eine Fähigkeit, die durch Adrenalin zu hemmen ist. Aber auch die blutdrucksenkende Wirkung von K wird, wenn beide Substanzen gleichzeitig injiziert werden, aufgehoben. Ebenso kommt es nicht zum vollständigen Durchbruch der blutdrucksteigernden Wirkung von Adrenalin. Anderen Sympathicomimetica wie Ephedrin, Benzedrin und Pervitin kommt eine derartige spezifische Hemmwirkung gegenüber K in derselben Stärke nicht zu.

3) Kallikrein in seinen Zusammenhängen mit Sympathicomimetica, Sympathicolytica, Parasympathicomimetica und Parasympathicolytica.

Parasympathicomimetica hingegen, wie Prostigmin oder Physostigmin vermögen die blutdrucksenkende Wirkung von K deutlich zu erhöhen. Durch Atropin wird andererseits die blutdrucksenkende Wirkung von K im allgemeinen nicht beeinflusst. Erst bei hoher Dosierung von Atropin (0,1-0,5 g) ist eine Hemmwirkung zu erkennen.

Sympathicolytica verstärken die Wirkung von K, aber

es wird nicht, wie bei den Parasympathicomimetica die Höhe des Blutdruckabfalles vergrößert, sondern vielmehr die Dauer der Blutdrucksenkung.

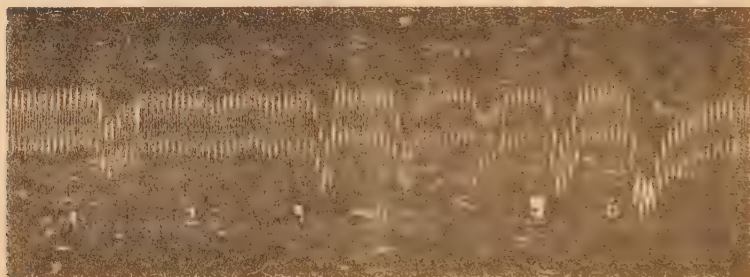


Abb:4

Hund, männl. 20 kg, Morphin-Pernocton Narkose. Direkte Blutdruckmessung durch das Ludwig'sche Quecksilber Manometer. Die Abb. zeigt die Veränderung der K-Wirkung durch Prostigmin.

1., 0,25 KE	2., 0,1 Prost.	3., 0,2 Prost.
4., 0,25 KE	5., 0,1 Prost.	6., 0,25 KE



Abb:5

Hund, männl. 15 kg, Morphin-Pernocton Narkose. Direkte Blutdruckmessung. Die Abb. zeigt die Veränderung der Wirkung von K nach vorheriger Injektion von CCK.

1., 0,8 KE

4) Zusammenfassung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Es ist aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht möglich,

die eingangs gestellte Frage nach dem Wirkungsmechanismus - die spezifische Grundreaktion von K - zu erkennen und endgültig zu beantworten.

II. Kallidin.

A) Einführung.

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, wird beim Versetzen von Blut oder Serum mit aktivem Kallikrein eine Substanz entwickelt, die selbst blutdruckaktive sowie darm- und uteruserregende Eigenschaften aufweist. Diese Substanz wurde Kallidin (DK) genannt. Die Freilegung von DK erfolgt aus einer im Serum vorhandenen inaktiven Vorstufe, dem Kallidinogen. Es ist anzunehmen, daß es sich bei dieser Reaktion um einen enzymatischen Vorgang handelt. Die Menge des jeweils im Ansatz vorhandenen DK, d.h. die Menge des aktivierten bzw. wieder inaktivierten DK ist aufgrund seiner darm- und uterusaktiven Wirkung am biologischen Testobjekt in jeder Phase des Reaktionsablaufes genau zu verfolgen.

a) Zur Technik der Testung die glatte Muskulatur erregender Substanzen am biologischen Testobjekt.

Als biologische Testobjekte für glattmuskulär aktive Substanzen, im vorliegenden Fall besonders für DK,

wurden im allgemeinen isolierte Darm- oder Uterus-Präparate von Meerschweinchen verwendet. Die Art und Stärke der durch die einzelnen Substanzen auslösbaren Kontraktionen diente als quantitativer und, soweit diese Technik eine Differenzierung einzelner Substanzen gestattet, auch als qualitativer Nachweis.

Zur Gewinnung der Testobjekte wurden die Tiere durch Nackenschlag betäubt, ausgeblutet und aus der eröffneten Bauchhöhle ein etwa 10cm langes Darmstück - etwa dem Caecum entsprechend - bzw. der Uterus entnommen. Das Darmstück wurde sodann durch mehrmaliges schonendes Durchspülen mit Tyrodelösung von seinem Inhalt gesäubert und vor seiner weiteren Verwendung mindestens 2 Stunden bei 0° im Eisschrank aufbewahrt. Entsprechend wurde mit den Uteruspräparaten verfahren. Zur Testung wurde ein etwa 2cm langes Stück des Darmpräparates oder 1 Uterushorn an einem Ende stabil in einem Suspensionsgefäß an einer Glashalterung befestigt und das andere Ende labil über einen Faden an dem Schreiberhebel eines Kymographions aufgehangen. Das Suspensionsgefäß, in dem sich das Organ während der Testung be-

fand, war über einem Hahn mit einer mit Tyrodelösung gefüllten Vorratsflasche verbunden, sodaß die Suspensionsflüssigkeit (etwa 10ml) jederzeit erneuert werden konnte. Eine ständige Luft- und Sauerstoffzufuhr zu dem suspendierten Organ wurde durch eine Pumpe gewährleistet. Die Testungen wurden im allgemeinen bei 35-37°C Badetemperatur durchgeführt. DK vermag den isolierten atropinisierten Meerschweinchendarm zu einer rasch zur maximalen Höhe ansteigenden Kontraktion zu erregen. Nach Erneuerung der Badflüssigkeit kehrt der Tonus des Darms ebenso rasch wieder zu seinem Ausgangsniveau zurück. Die Art der Kontraktion ist also etwa der von Histamin ähnlich. Diese Art der Darmerregung durch DK stellt die ideale Form dar. Sie ist bei Serum-Kallikrein-Präparaten oder anderen auf bestimmte Weise gewonnenen DK-Lösungen zu beobachten. Es sind jedoch auch je nach der Art der Ansprechbarkeit des Darmes und auch je nach Art der vorhandenen Begleitsubstanzen im jeweiligen DK-Präparat mehr oder weniger stark von dieser Idealform abweichende Kontraktionskurven zu beobachten, die durchaus noch als von DK verursacht anzuerkennen sind. DK

ist am isolierten Meerschweinchendarm jedoch nicht nur qualitativ - innerhalb gewisser Grenzen - nachweisbar, sondern ebenso auch quantitativ.

Dies bedeutet, daß bei der Freilegung von DK aus Serum die jeweils im Inkubationsgemisch vorliegende DK-Menge direkt durch Testung am isolierten Meerschweinchendarm zu bestimmen ist.

b) Untersuchung und Darstellung der im Serum bei der Kallidinfreilegung ablaufenden Reaktionsvorgänge.

Werden 2ml frisches Serum, z.B. vom Rind, mit 1 E Kallikrein (KE) aus Harn, Speicheldrüsen, Pankreas oder Blut versetzt, so kommt es bereits unmittelbar nach Beginn der Inkubation zur Freisetzung von DK in dem Inkubationsgemisch. Die Menge des freigesetzten DK nimmt bis zu einem bestimmten Optimum kontinuierlich zu - meist ist dieses nach 2-3 Minuten erreicht - und wird sodann wieder langsam vermindert. Im unveränderten Serumansatz ist 10-15 Min. nach Beginn der Inkubation mit K kein DK mehr nachweisbar.

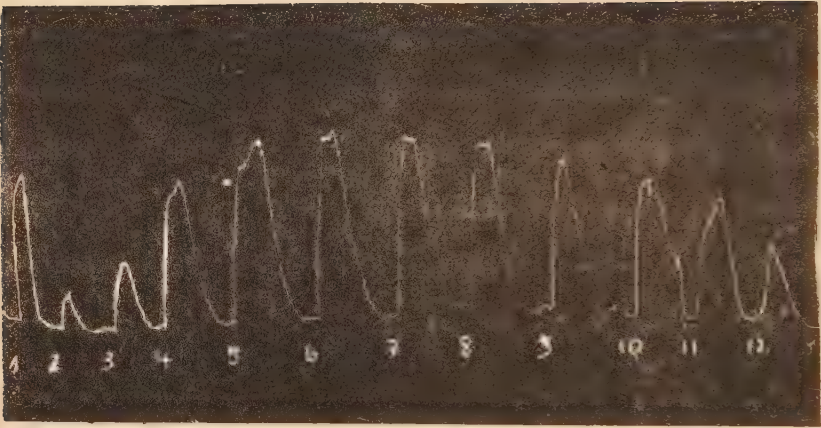


Abb: 6

Erregung eines etwa 2 cm langen Darmstückes vom Meerschweinchen durch ein Serum-K Inkubationsgemisch.

- 1., 0,1γ Histamin 2., 0,2 ml Rinderserum
3., 0,2 ml eines Ansatzes von 2ml Serum + 1mg K (submax.)
4., 0,2 ml des Ansatzes nach 3 Min langer Inkubationszeit.
5., 0,2 ml "-" 6 Min. 6., 0,2 ml "-" 10 min. 7., 0,2ml "-" 12 Min.
8., 0,2 ml "-" 14 Min. 9., 0,2 ml "-" 17 Min. 10., 0,2ml "-" 21 Min.

In dem Seruminkubationsgemisch laufen also mindestens

2 Reaktionen nebeneinander. Die erste ist die Frei-

legung von DK aus seiner inaktiven Vorstufe. Sie

stellt sich am biologischen Testobjekt in der kontinu-

ierlichen Zunahme der Aktivität des Inkubationsgemis-

ches bis zu einem Optimum dar. In dem darauf folgen-

den mehr oder weniger raschen Absinken der Aktivität

wird das Überwiegen einer der Aktivierungsreaktion

entgegengerichteten Reaktion deutlich, der Inaktivie-

rung des gebildeten DK. Da diese beiden Reaktionen

nicht nur im Serum, also bei Vorhandensein beider

Reaktionskomponenten im System, sondern auch bei

entsprechender Trennung von Kallidinogen und DK zu beobachten sind, darf der oben angenommene Reaktionsablauf in dem Inkubationsgemisch als gesichert angesehen werden (s. Abb.6). Aber noch eine dritte Reaktion wird im Serum nach Zugabe von K ausgelöst. Wie bereits im Teil I. dieser Arbeit erwähnt, wird K durch eine im Serum vorhandene inaktivierende Substanz inaktiviert.

Wird frisches Serum mit K versetzt und nach Ablauf der DK-Freilegungsreaktion nochmals frisches Serum zu dem Inkubationsgemisch zugegeben, so erfolgt keine weitere Freilegung von DK. Das in dem Inkubationsgemisch vorhandene K muss also durch das Serum in seiner Fähigkeit, DK zu bilden gehemmt worden sein. Ebenso ist auch die zweite pharmakologische Eigenschaft von K, seine blutdrucksenkende Wirkung, durch erneute Zugabe von Serum zu hemmen. Die Inaktivierung ist reversibel und kann z.B. durch Ansäuern des Inkubationsgemisches wieder rückgängig gemacht werden. Eine schematische Darstellung der erwähnten nebeneinander im Inkubationsgemisch ablaufenden Vorgänge gibt nachfolgende Skizze:

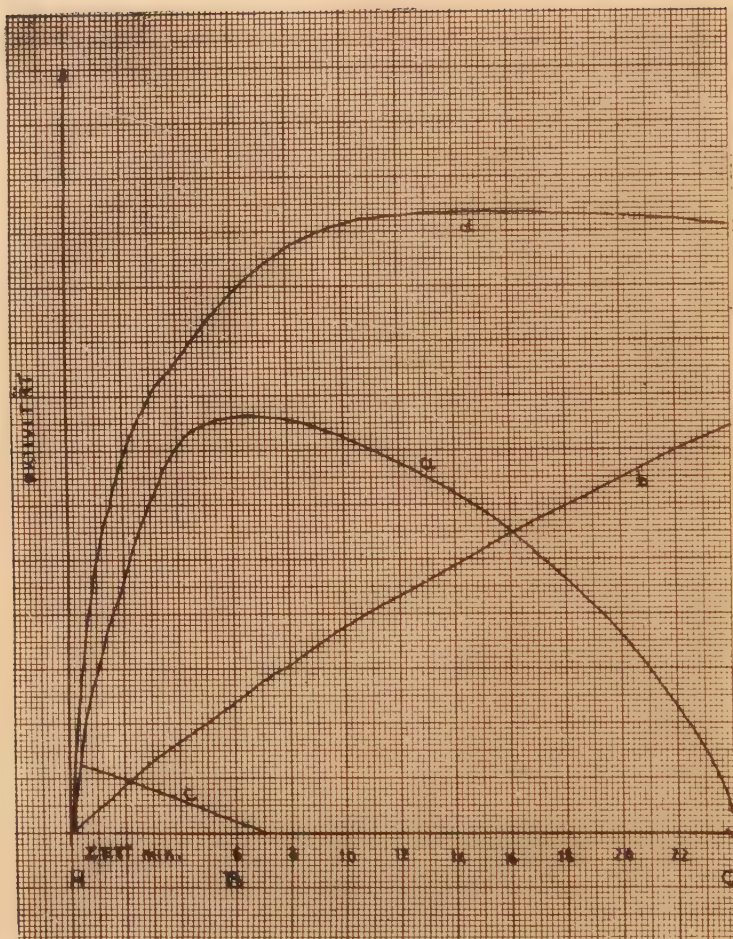


Abb.7. Schematische Darstellung der DK-Freilegung.
Erklärung:

Kurve a stellt die Freilegung von DK innerhalb eines bestimmten Zeitabschnittes dar, wie sie am isolierten Darm- oder Uterus-Präparat nachweisbar ist.

Kurve b zeigt die gleichzeitig stattfindende Inakti-

vierung von DK,

Kurve c veranschaulicht die Inaktivierung von K,

Kurve d würde die theoretisch durch eine bestimmte

kE-Menge freizulegende DK-Menge darstellen,

Punkt A stellt den Beginn der Inkubation dar,

Punkt B das Maximum der freigelegten, d.h. am isolier-

ten Meerschweinchendarm nachweisbaren DK-

Menge.

Im Punkt C sind die ausgelösten Reaktionsvorgänge a

und c beendet. DK ist nicht mehr nachweisbar.

Die bei den genannten Reaktionsabläufen auftretenden

proteolytischen Vorgänge wurden auch durch Titration

der freigesetzten Säuremengen mittels alkoholischer

Kalilauge und einer 0,5%igen Thymolphthaleinlösung

als Indikator bestätigt (Berek, Diss. 1948).

B) Isolierung und Anreicherung der einzelnen an der
Kallidinfreilegung beteiligten Reaktionskomponenten.

a) Gewinnung der inaktiven Vorstufe von Kallidin, dem
Kallidinogen aus Serum.

1) Definition.

Als Kallidinogen wird ein Substrat des K bezeichnet, das hochmolekularer Natur, thermolabil und durch Säuren und Laugen leicht zerstörbar ist.

2) Vorkommen von Kallidinogen im Organismus.

Kallidinogen findet sich im Serum von Menschen, Rind, Hammel, Hund, Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen, nicht aber im Serum von Pferden und Schweinen. Weiter wurde Kallidinogen in geringen Mengen im Pankreas und den Nieren nachgewiesen, nicht in der Leber, dem Duodenum, der Muskulatur und der Haut. Knochenmark enthält im allgemeinen eine dem Kallidinogen verwandte Substanz, das Bradykininogen, in relativ großen Mengen. Es wird darauf noch zurückzukommen sein.

3) Versuche, Kallidinogen durch spezifische Adsorption
aus Serum anzureichern und zu isolieren.

a) Adsorption von Kallidinogen an Aluminiumoxyd.

Serum vom Rind wurde mit der halben bis doppelten Gewichtsmenge an Aluminiumoxyd (nach Brockmann) versetzt. Nach 15 Minuten langem Rühren wurde der Niederschlag abzentrifugiert und der Rückstand mit einer der Serummenge entsprechenden Volummenge Wasser bei pH 5-8 fraktioniert eluiert. Es war in keinem Fall eine wesentliche Adsorption von Kallidinogen aus Serum an das Aluminiumoxyd festzustellen. Ebenso wenig wurde eine elektive Trennung des Kallidinogens vom Kallidininaktivator erreicht.

b) Gewinnung von Kallidinogen durch Fraktionierung
von Serum an der Aluminiumoxyd-Säule.

Der Versuch, Kallidinogen aus Serum durch Fraktionierung an einer Säule von Aluminiumoxyd zu gewinnen, zeigte bessere Erfolge. Es wurden 500ml frischen Rinderserums durch eine Aluminiumoxydsäule ($\varnothing$ 6cm, Länge 24cm), die mit 0,1n Natronlauge oder 1%iger Ammoniaklösung vorbehandelt war, geschickt und das Eluat in Fraktionen von je 100ml aufzufangen. Die ersten leicht

gelblich gefärbten Eluate wiesen einen maximalen, etwa dem Serum entsprechenden Kallidinogengehalt auf. Die nachfolgenden Eluate waren nach Inkubation mit K am isolierten Meerschweinchendarm nur schwach wirksam, sie enthielten also wenig oder kein Kallidinogen. Das in den ersten Fraktionen enthaltene Kallidinogen war bei Aufbewahren im Eisschrank über mehrere Tage unbegrenzt haltbar. In seiner Aktivierbarkeit durch K glich es im wesentlichen dem noch im Verband des Serums stehenden Kallidinogen. Der im Serum vorhandene Inaktivator von DK war durch dieses Verfahren weitgehend abzutrennen. Die durch Behandeln von Serum mit Aluminiumoxyd erzielten Anreicherungen von Kallidinogen waren jedoch letzten Endes zu unspezifisch, um einen wesentlichen Reinigungsschritt in der Kallidinogengewinnung darzustellen. Es wurde deshalb versucht, durch spezifische Adsorptionsmittel entweder das Kallidinogen aus dem Serum oder zumindest den DK-Inaktivator zu eliminieren.

γ) Adsorption von Kallidinogen an Fullererde.

Als ein geeignetes Adsorptionsmittel für Kallidinogen

erschien zunächst Fullererde. Das Kallidinogen wurde aus dem Serum jedoch so vollständig und fest adsorbiert, daß es nicht mehr möglich war, es ohne zu zerstören wieder zu eluieren.

6) Adsorption von Kallidinogen an Permutit.

Ein Versuch mit Permutit zeigte, daß weder Kallidinogen noch der Kallidin-Inaktivator spezifisch adsorbiert wurde.

7) Adsorption von Kallidinogen an Bleichererde.

Durch Bleichererde wurde zwar der Kallidininaktivator adsorbiert, doch war seine Eliminierung aus dem Serum, ähnlich wie bei Aluminiumoxyd, nur teilweise zu erreichen, sodaß auch dadurch kein wesentlicher Reinigungsschritt zu erzielen war. Der Versuch, Kallidinogen aus Serum durch Adsorption in spezifischer Weise zu eluieren, war bei keiner der bis jetzt angewandten Methoden zu erreichen. Es wurde deshalb versucht, Kallidinogen aus Serum durch Fällungsmittel in mehr oder weniger spezifischer Weise auszufällen und damit einer Anreicherung der Verbindung näherzukommen.

4) Versuche, Kallidinogen durch fraktionierte Fällung
von Serum anzureichern und zu isolieren.

a) Fällung von Serum mit Casein.

In Anlehnung eines von Werle und Berek beschriebenen Verfahrens zur Abtrennung des DK-Inaktivators aus Rinderserum wurde Kallidinogen durch Fällung des Serums mit Casein anzureichern versucht. Dazu wurden 10ml Rinderserum, die auf möglichst tiefe Temperaturen (-1°) vorgekühlt waren, mit 60ccm einer 0,25%igen ebenfalls auf -1° vorgekühlten Caseinlösung versetzt und unter ständigem Rühren 50ccm eines Acetatpuffers von pH 4,6-4,7 zugegeben. Nach Absetzen des voluminösen Niederschlages wurde das Gemisch bei 0° zentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert und mit Natronlauge neutralisiert. Dieser Überstand schien einerseits hohe Mengen an Kallidinogen zu enthalten und andererseits nur sehr geringe Mengen an DK-Inaktivator. Im Vergleich zu der normalerweise im Serum nachweisbaren Kallidinogenmenge wies diese nach Caseinfällung des Serums gewonnene Lösung eine 2-3-fach stärkere DK-Entwicklung auf. Es wurde sogar eine 14-fach höhere Kallidinentwicklung festgestellt

(Berek, -Diss. 1948). Diese hohen Ausbeuten dürften zum Teil durch die darmsensibilisierende Eigenschaft der Kallidinlösung zu erklären sein. Zum Teil ist jedoch auch der geringe DK-Inaktivator-Gehalt für diese scheinbare Vermehrung des Kallidinogen-Gehaltes verantwortlich. Die darüber hinausgehende Aktivitätssteigerung kann aber nur durch Aktivierung irgendwelcher in Casein vorhandener Substanzen erklärt werden. Allerdings führt K bei Inkubation mit einer Caseinlösung nicht zur Freilegung von darm- und uterusaktiven Substanzen.



Abb:8

Vergleich der darmerregenden Wirkung von DK aus Normalserum und DK aus einer durch Caseinfällung angereicherten Kallidinogenlösung.

- 1., 0,25 ml eines Ansatzes von 1ml Rinderserum + 1 KE nach 3 Min
- 2., 0,25 ml dieses Ansatzes nach 5 Min. langer Inkubation.
- 3., 0,25 ml dieses Ansatzes nach 10 Min. langer Inkubation.
- 4., 0,5 ml eines Ansatzes von 2 ml Kallidinogenlsg. + 1 KE 10 M
- 5., 0,5 ml dieses Ansatzes nach 30 Min langer Inkubation.
- 6., 0,5 ml dieses Ansatzes nach 50 Min langer Inkubation

Trotz dieser ziemlich hoch erscheinenden Anreicherung von Kallidinogen und der weitgehenden Abtrennung des Kallidinogen-Inaktivators erscheint jedoch diese Methode der Kallidinogengewinnung nicht geeignet für die Herstellung von DK. Erstens wird durch die Fällungsreaktion des Serums dieses so stark verdünnt (1:11), daß eine erneute Konzentrierung der gewonnenen Kallidinogenlösung notwendig erscheint und zweitens läßt auch die Art der zu beobachtenden darmerregenden Wirkung daraus hergestellter Kallidinpräparate auf die Anwesenheit von Substanzen schließen, die den Darm zu starker Eigenaktivität anregen und auch schädigen. Auch diese Stoffe müßten erst aus den DK-Lösungen entfernt werden. Darüber hinaus besteht, wie bereits erwähnt, Veranlassung anzunehmen, daß nicht die gesamte der zu beobachtenden Aktivität auf DK zurückzuführen ist.

Eine weitere Möglichkeit, bestimmte Eiweißkörper des Serums in mehr oder weniger spezifischer Weise anzureichern, ist durch fraktionierte Fällung des Serums mit Ammonsulfat gegeben.

B) Fällung von Serum mit Ammonsulfat.

In einem entsprechenden Versuch wurde frisches Rinderserum zunächst zu 30 Vol.% mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der erhaltene Niederschlag abzentrifugiert und in der ursprünglichen Volummenge Aqua dest. wieder gelöst. Sodann wurde die Suspension 3 Tage gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert, um niedermolekulare Stoffe des Serums sowie den Gehalt an Ammonsulfat aus der Lösung weitgehend zu vermindern. Die nach 30%-iger Sättigung des Serums mit Ammonsulfat verbliebene Restlösung wurde mit weiteren 10Vol.% gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und der ausgefallene und abzentrifugierte Niederschlag in der oben beschriebenen Weise weiter verarbeitet. So wurden aus dem Serum durch noch viermal wiederholte Zugabe von je 10% gesättigter Ammonsulfatlösung zur jeweils verbleibenden Restlösung des Serums eine Sättigung bis zu 80% vorgenommen. Die abzentrifugierten Niederschläge wurden in der angegebenen Weise weiter verarbeitet.

Testung der Niederschläge auf ihren Kallidinogen-

Gehalt:

Der bei 30Vol.% mit Ammonsulfatlösung aus dem Serum ausgefällte Niederschlag wies kein Kallidinogen auf. Geringe Mengen an Kallidinogen waren bei 40%iger Ammonsulfatsättigung des Serums ausgefällt worden, während die bei 50, 60 und 70%iger Ammonsulfatsättigung gefällten Niederschläge einen optimalen Gehalt an Kallidinogen aufwiesen. Das Maximum lag bei 60%iger Sättigung. Der bei 80%iger Sättigung mit Ammonsulfat aus Serum ausgefällte Anteil enthielt kein Kallidinogen, ebenso war auch in der verbliebenen Restlösung des Serums kein Kallidinogen nachzuweisen. Der DK-Inaktivator war durch Ammonsulfatsättigung des Serums nur zum Teil vom Kallidinogen abgetrennt worden.

Die weiteren Versuche, Kallidinogen aus Serum durch Fällung mit Ammonsulfat zu isolieren, wurden durch eine erste Sättigung des Serums mit Ammonsulfat bis zu 40% vorgenommen, der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Er enthielt wenig oder kein Kallidinogen. Die

aus dieser ersten Fällung des Serums verbliebene Restlösung wurde nun bis zu 70% mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in etwas Aqua dest. aufgeschwemmt und wie oben erwähnt 3 Tage gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Das Kallidinogen war in dieser Lösung in optimaler Menge nachweisbar. Die Lösung war klar und durchsichtig, ihr Inaktivatorgehalt gering. Ihr Trockengewicht betrug bei gleichem Kallidinogen-Gehalt 0,0117 g/ml gegenüber 0,0807g/ml des Serums. Es war durch die Fällung des Serums mit Ammonsulfat also eine 6-7-fache Anreicherung erzielt worden. Die Feststellung des Kallidinogengehaltes in den durch Ammonsulfatsättigung erhaltenen Niederschlägen erfolgte wie üblich indirekt durch Bestimmung der durch K-Zusatz freilegbaren DK-Menge am isolierten Meerschweinchendarm.

γ) Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.

Aus dem beschriebenen Anreicherungs- und Isolierungsverfahren lassen sich keine über die eingangs gegebene Definition von Kallidinogen hinausgehende Feststellungen treffen.

Die bis jetzt in der Literatur beschriebenen Untersuchungen über den Kallidinogengehalt im Serum unter physiologischen und pathologischen Stoffwechselzuständen sind zu gering, um daraus Anhaltspunkte für die Bedeutung des Kallidinogens im Organismus gewinnen zu können.

Eine Feststellung, der in diesem Zusammenhang vielleicht Bedeutung zukommt, ist der auffallend hohe Gehalt des roten Knochenmarkes von Rind, Pferd, Schwein und Hammel an der Vorstufe einer dem DK sehr nahe verwandten, wenn nicht identischen Substanz, dem Bradykinin.

Bradykinin ist ebenso wie DK im Serum in einer inaktiven Form, dem Bradykininogen vorhanden. Eine Unterscheidung dieser beiden Vorstufen ist im Serum bis jetzt nicht sicher möglich, wohl aber im roten Knochenmark. Es wäre denkbar, daß die Bildungsstätte der Vorstufen von DK und Bradykinin im Knochenmark liegt. Für Bradykinin dürfte diese Annahme zutreffen (E. Werle u. F. Preisser: Klin. Wschr. 34, 37/38, 1042, 1956); für Kallidinogen scheint erst eine weitergehende Differenzierung dieser Vorstufe - sofern man eine gemeinsame annehmen will - notwendig, wie sie im Blut, bzw. Serum vorliegt.

b) Anreicherung und Isolierung von Kallidin.

1) Eigenschaften und Vorkommen von Kallidin im Organismus.

Kallidin (DK), das durch Kallikrein (K) aktivierte Kallidinogen stellt eine niedermolekulare weitgehend thermostabile und gegenüber Laugen empfindliche Substanz dar. Gegenüber Säure erweist sich DK als stabil.

Sein Vorkommen im Organismus beschränkt sich, soweit ein direkter Nachweis möglich ist, nur auf seine inaktiven Vorstufen (siehe Seite 47, Abschn. B.a.2.).

Bei den im Blut von vorneherein vorhandenen und auch in den übrigen Organen eines Organismus nachweisbaren darm- und uterusaktiven Substanzen dürfte es sich im allgemeinen nicht um DK handeln. Soweit ein direkter Nachweis erbracht werden konnte, ist diese Eigenaktivität auf Substanzen zurückzuführen wie Histamin oder Acetylcholin, sofern nicht ein spezifisches Gewebsprotein, wie z.B. Substanz P, in Frage kommt.

Die Gewinnung von DK kann also nur auf indirektem Wege

über die Aktivierung seiner Vorstufe erfolgen.

2) Möglichkeiten und Wege der Kallidin-Darstellung.

Kallidinogen kommt, wie schon erwähnt, nur im Serum in relativ hohen Mengen vor. Die übrigen Organe enthalten kein oder nur geringe Mengen an Kallidinogen. Es wurde deshalb für die Gewinnung von Kallidinogen, wie auch von DK, im allgemeinen frisches Serum vom Rind verwendet. Die möglichen Verfahren, DK daraus zu gewinnen bestehen

1. in der weitgehenden Isolierung der Vorstufe, ihrer Aktivierung durch K und Reindarstellung des gebildeten DK,
2. in einer Aktivierung des Kallidinogens, im unvorherbehandelten Serum und Isolierung des gebildeten DK aus dem Inkubationsgemisch.

Von den beiden Möglichkeiten bietet letztere den Vorteil, im DK die weniger empfindliche Substanz aus dem Serum isolieren zu können. Der Weg der Anreicherung und Gewinnung von DK wird dadurch wesentlich verlustärmer.

a) Anreicherung und Isolierung von Kallidin aus einem Serum-Kallikrein-Inkubat.

Das zur DK-Gewinnung verwendete Serum, im allgemeinen Rindermischserum, wurde zur Entfernung der niedermolekularen und zum Teil auch darmaktiven Substanzen zunächst 3 Tage gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Der Kallidinogengehalt im Serum wird dadurch nicht wesentlich vermindert. Sodann wurde die zur Aktivierung des Kallidinogens notwendige K-Menge sowie die optimale Bildungs- und Inaktivierungszeit von DK (Punkt B und C der Abb.7) in einem Vorversuch ermittelt. Die Inkubation im Hauptversuch erfolgte nach diesen Werten. Nach Ablauf der optimalen Aktivierungszeit von DK wurde die dann merklich stärker werdende Inaktivierungsreaktion durch Zugabe von 1%iger Schwefel-, Salz- oder Essigsäure bis pH 3 unterbunden. Es kommt dadurch auch die weitere Freilegung von DK aus Kallidinogen zum Stillstand, da durch die zugegebene Säure das Kallidinogen geschädigt wird. Zugabe von heissem Äthanol zu dem Inkubationsgemisch führt zwar auch zur Hemmung der Aktivierungs- und Inaktivierungsreaktion, doch werden damit weitere Reaktionen in dem Serum-Inkubationsgemisch ausgelöst, die dann von

sich aus zur Aktivierung darm- und uterusaktiver Substanzen führen können (Siehe Teil III). Die zur Abstopfung der im Inkubationsgemisch ablaufenden Inaktivierungsreaktionen notwendigen Säurezusätze durch gleichzeitig stattfindende Abtrennung des gebildeten DK vom Inkubationsgemisch etwa durch Dialyse zu umgehen war nicht möglich, da das gebildete DK zu wenig schnell die Membran passieren konnte, um der Inaktivierung zu entgehen. Auch der Zusatz von Cystein zum Inkubationsgemisch, das die Inaktivierung von DK zu hemmen vermag, erwies sich nicht als genügend wirksam. Es blieb deshalb nur die Möglichkeit, das gebildete DK aus dem durch Säurezusatz inaktivierten Inkubationsgemisch möglichst rasch durch Dialyse gegen Aqua dest. zu entfernen.

a) Gewinnung von Kallidin durch Dialyse des Inkubationsgemisches und Weiterverarbeitung des Aussendialysates.

Das Seruminkubationsgemisch wurde in einen Cellophanbeutel gefüllt und in einem, die doppelte Volummenge Aqua dest. fassenden Glaszylinder durch einen Motor in ständiger Rotationsbewegung gehalten. Die Aussenflüssigkeit wurde 3-4mal gewechselt. Infolge seiner niedermolekula-

ren Natur dialysiert das im Inkubationsgemisch enthaltene DK zum größten Teil aus. DK war also durch dieses Verfahren bereits in weitgehend gereinigtem Zustand zu gewinnen. Da das DK in den gewonnenen Aussendialysaten aber in sehr hoher Verdünnung vorlag, wurde die Einengung dieser Aussendialysate notwendig. Sie wurde in einer Vakuumapparatur unter Stickstoff bei einer Temperatur von 30-40°C vorgenommen. Die DK-Lösung wurde auf etwa 1/10 der ursprünglichen Volumenmenge des Serums eingeeengt. Trotzdem dieser Reinigungsschritt so schonend wie möglich ausgeführt wurde, wiesen die erhaltenen DK-Präparate einen Aktivitätsverlust von etwa 50% gegenüber der Ausgangslösung auf. Die durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen ergaben 3-4mg Trockensubstanz pro Einheit an DK. Ca. 30% davon waren auf anorganische Bestandteile zurückzuführen.

Abb: 9
Vergleich der darm-
kontrahierenden
Wirkung von DK mit
der von Histamin.

- 1., 0,1 einer Ein-
heit an DK.
- 2., 1γ Histamin.



Eine Einheit an DK entspricht in seiner Wirkung am Darm etwa der von 10 γ Histamin. Im allgemeinen wird also eine Einheit DK als die Menge darmaktiver Substanz bezeichnet, die aus 10 mg Menschentrockenplasma durch 1 KE freigelegt wird.

α_1) Papierchromatographische Untersuchung des gewonnenen Kallidinpräparates.

Die aufsteigende Papierchromatographische Analyse der Präparate im Butanol-Eisessig-Wasser (80:20:20) als Lösungsmittel ergab etwa 15 ninhydrinpositive Zonen von verschiedenem RF-Wert. DK erweist sich dabei als relativ langsam laufende ninhydrinpositive Substanz. Durch eine Lösung von Eisessig und Wasser 2:8 ist DK aus dem Papier wenigstens zum Teil wieder zu eluieren. Die nochmalige papierchromatographische Analyse eines derartigen Einzelstreifeneluates ergab seltsamerweise erneut eine Aufteilung in etwa 4 ninhydrinpositive Flecke von verschiedenem RF-Wert.

Einen prozentual hohen Anteil bei all diesen DK-Präparaten schien eine chromatographisch dem Prolin ähnliche Sub-

stanz einzunehmen. Für eine wirksame Anreicherung von DK ist die papierchromatographische Auftrennung und Elution der eingeeengten DK-Lösungen nicht geeignet. Die eluierbaren Mengen an DK bleiben selbst bei entsprechender Variation der Methode zu gering, um auf der notwendig breiten Basis weitere Untersuchungen zu ermöglichen.

α₂) Weitere Anreicherung der gewonnenen Kallidin-Lösung durch die Gegenstromverteilung.

Diesem Nachteil der papierchromatographischen Anreicherungsmethode zu begegnen schien durch das Verfahren der Gegenstromverteilung möglich. Der Versuch wurde mit 8 und 16 Rohren durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Butanol-Wasser verwendet. Mobile Phase war die untere, also das butanolgesättigte Wasser. Vor jeder Weitergabe der Phasen wurden je 25 Umschüttelungen von Hand vorgenommen. Der bei 8 Rohren durchgeführte Versuch der Gegenstromverteilung ergab die maximale Aktivität in Rohr 8. Rohr 7 wies etwa noch 25% der Gesamtaktivität auf, während in Rohr 6 noch etwa 4% enthalten waren.

In dem maximal aktiven Rohr 8 entfielen auf 1 Einheit

DK etwa 2,7mg Trockensubstanz, etwa 40% davon waren auf anorganische Bestandteile zurückzuführen. Die Ausgangslösung wies ein Trockengewicht von 3,7mg pro Einheit DK auf.

Ein mit 16 Rohren durchgeführter Versuch der Gegenstromverteilung ergab ähnlich dem obigen Versuch ansteigende Aktivität von Rohr 10-16. Der Reinigungseffekt war rein optisch gesehen sehr deutlich. Die am stärksten wirksamen Rohre 15 und 16 waren klar und durchsichtig gegenüber der starken ockergelben Färbung der Ausgangslösung. Die bei allen 16 Rohren durchgeführte Trockengewichtsbestimmung zeigte, daß die Wirksamkeit am Darm der Höhe des jeweiligen Trockengewichtes etwa parallel verlief. Rohr 16 wies die stärkste Aktivität aber auch das höchste Trockengewicht auf. Andererseits wies das Verhältnis der organischen zu den anorganischen Trockengewichten eine Verschiebung zugunsten der organischen Substanzen auf. Im Ausgangspräparat entfielen auf 7 Teile organischer Substanz 3 Teile anorganische, während nach der Reinigung des Präparates durch Gegenstromverteilung im maximal wirksamen Rohr 16 dieses Verhältnis auf etwa 5:5 verschoben

war. Eine mit Proben aller 16 Rohre durchgeführte papierchromatographische Analyse (Schleicher-Schüll 2043 b) in Butanol-Eisessig-Wasser (40:10:50) als Lösungsmittel ergab bei Rohr 5-6 3-4 stark ninhydrinpositive Zonen verschiedener RF-Werte. Ebenso zeigten die Rohre 14, 15 und 16 etwa 5 ninhydrinpositive Zonen. Die übrigen Rohre wiesen nur geringe oder keine Anfärbbarkeit mit Ninhydrin auf.

Das Trockengewicht der Ausgangslösung von DK betrug 45mg pro Einheit DK. Rohr 16 wies noch etwa 10mg pro Einheit auf, 50% davon entfielen auf anorganische Bestandteile, sodaß letztlich 5mg organischer Substanz einer Einheit DK entsprachen.

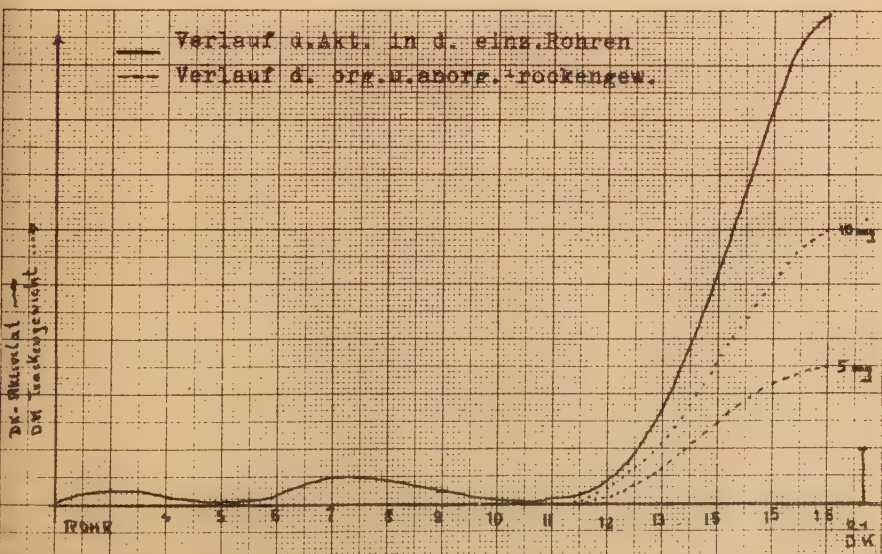


Abb:10 Reinigung und Anreicherung von DK durch Gegenstromver-

Wie bereits erwähnt lässt sich 1 Einheit DK in seiner Wirksamkeit am isolierten, atropinisierten und in Tyrodelösung suspendierten Meerschweinchendarm etwa der von 10 γ Histamin vergleichen. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, daß die Empfindlichkeit eines Darmstückes für Histamin der für DK durchaus nicht an jedem Darm und Uterus in gleicher Weise zu entsprechen braucht. Manche Darmpräparate scheinen für DK wenig oder gar nicht ansprechbar, während die Ansprechbarkeit für Histamin unvermindert zu sein scheint.

B) Vor- und Nachteile der Dialysiermethode. Diskussion
weiterer Möglichkeiten der Kallidin-Gewinnung.

Die beschriebenen Reinigungs- und Anreicherungs-schritte für DK stellen zwar einen möglichen Weg seiner Isolierung dar, doch erweist sich diese Methodik im ganzen gesehen als zu verlustreich, um zu wesentlichen Endausbeuten zu gelangen. Jeder der angegebenen Reinigungsschritte bedeutet einen Verlust von 30-50% gegenüber der jeweiligen Ausgangsaktivität, sodaß letzten Endes nur mit einer Gesamtausbeute von maximal 10-20% zu rechnen ist. Dieser hohe Verlust erklärt sich aus der hohen Empfindlichkeit

und Unbeständigkeit der DK-Präparate, die offenbar mit dem Grad ihrer Reinheit stark zunimmt.

Es war deshalb zu versuchen

1. die Anzahl der zur Anreicherung des DK notwendigen Reinigungsschritte soweit als möglich zu reduzieren und
2. Anreicherungsverfahren zu wählen, die DK möglichst wenig zu verändern und zu zerstören vermögen. Die Gefahr, anstelle physiologischer Substanzen irgendwelche Kunstprodukte zu isolieren, nimmt bekanntlich mit dem Grad der unphysiologischen Arbeitsweise zu. Aber noch ein weiterer bereits erwähnter Grund lässt diese Forderung notwendig erscheinen. Wie in Teil III. dieser Arbeit näher auszuführen sein wird, können Eingriffe in die biologische Struktur des Serums, wie sie bei Anreicherungsverfahren biologisch aktiver Substanzen im allgemeinen angewendet werden, im Anreicherungsmedium von sich aus bereits Reaktionen auslösen, die eine Freisetzung darm- und uterusaktiver Substanzen bewirken. Bei ungenügender Abgrenzung der Präparate nach jedem Reinigungsschritt kann so eine Einheitlichkeit der angereicherten aktiven Substanz vorgetäuscht werden, während es sich tatsächlich um eine

Summationswirkung einer Reihe inzwischen aktivierter pharmakologisch gleich wirksamer Substanzen handelt.

Ein Verfahren, das diese Voraussetzung möglichst weitgehend zu erfüllen scheint, ist in der Adsorption des DK an Aktivkohle aus dem K-Serum-Inkubationsgemisch unmittelbar nach seiner Aktivierung gegeben. Die dabei stattfindende laufende Eliminierung des gebildeten DK aus dem Inkubationsgemisch führt zu einer Verschiebung des Reaktionsgefälles zugunsten der Seite des gebildeten DK. Die Reaktion zwischen K und Kallidinogen kann also theoretisch bis zur vollständigen Aktivierung des gesamten Kallidinogens ablaufen. Schematisch lässt sich dieser Vorgang in folgender Weise darstellen:



Auf normale Verhältnisse angewandt würde diese Formel bedeuten, daß alles im Serum vorhandene Kallidinogen zu DK aktiviert wird. Dies ist weder in vivo noch in vitro der Fall. Setzt man einem Serum-K-Inkubationsgemisch nach Ablauf der oben erwähnten DK-Bildungs- und Inaktivierungs-

reaktionen erneut K zu, so kommt es auch erneut zur Bildung von DK. Daraus geht hervor, daß nicht alles im Serum vorhandene Kallidinogen durch das erstmals zugeführte K aktiviert wurde. Die DK-Bildung nimmt bei wiederholtem K-Zusatz etwa logarithmisch ab. Dies bedeutet, daß zwischen dem gebildeten DK und dem Kallidinogen ein Reaktionsgleichgewicht bestehen muss, sodaß die Anhäufung von DK, dem aktivierten Substrat, dem Aktivierungsvorgang entgegenwirkt und damit die Reaktion zwischen K und Kallidinogen zum Stillstand kommt, noch bevor alles Kallidinogen aktiviert ist. Das oben angeführte Schema ist also in folgender Weise zu ergänzen:



γ) Isolierung von Kallidin aus einem Kalikrein-Serum-Inkubat durch Adsorption des gebildeten Kallidins an Tierkohle.

γ₁) Ohne Cysteinschutz.

Versuchsbeschreibung: 100ml frisches dialysiertes Rinder-serum wurde mit 50KE inkubiert, 3 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und sodann mit 5g Aktivkohle (Carbo acti-

vatus Merck) versetzt. Zur Kontrolle der Menge des gebildeten oder wieder inaktivierten bzw. von der Kohle adsorbierten DK erfolgte eine laufende Testung des Inkubationsgemisches am isolierten Meerschweinchendarm. Es zeigte sich dabei, daß nach 10 Minuten keine Aktivität mehr im Versuchsansatz vorhanden war. Das gebildete DK war also entweder an die Kohle adsorbiert worden oder aber durch den noch im Serum unverändert vorhandenen Inaktivator vor seiner Adsorption an die Kohle inaktiviert worden. Um die beiden Möglichkeiten gegeneinander abzugrenzen, wurde versucht, eventuell an die Kohle adsorbiertes DK wieder zu eluieren. Es war jedoch durch keines der angewandten Verfahren möglich, wesentliche Mengen an DK aus dem abzentrifugierten Kohlenniederschlag zurückzugewinnen. So musste angenommen werden, daß das gebildete DK noch vor seiner Adsorption an die zugegebene Kohle inaktiviert worden war. Es war deshalb notwendig, die Inaktivierung des gebildeten DK in dem Versuchsansatz entweder ganz auszuschalten oder möglichst weit hintanzuhalten.

γ₂) Mit Cysteinschutz.

Wie aus früheren Versuchen bekannt, gelingt die Blockierung des DK-Inaktivators durch Zugabe von Cystein zum Inkubationsgemisch. So wurde in einem weiteren Ansatz von 100ml frischem Rinderserum + 50KE etwa 2 Minuten nach Inkubationsbeginn - also noch vor dem DK-Bildungsoptimum - 10mg Cysteinhydrochlorid in 5ml H₂O gelöst zu dem Inkubationsgemisch gegeben, und das Ganze 2 Min. später mit 5g Aktivkohle verrührt. Die zur Kontrolle der im Inkubationsgemisch ablaufenden Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgänge am isolierten Meerschweinchendarm vorgenommene laufende Testung ergab eine innerhalb 30 Minuten nur langsam absinkende Aktivität. Dies bedeutet, daß die Bildung und die Adsorption von DK an die Kohle etwa gleich stark verliefen. Die Inaktivierung des gebildeten DK dürfte daneben kaum noch eine Rolle spielen.

γ₃) Rückgewinnung des an die Kohle adsorbierten Kalli-

dins durch Elution des Niederschlages mit Aqua dest.

Nach 30 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur wurde der Versuchsansatz bei 3000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert und der Niederschlag

mit der der ursprünglichen Serummenge entsprechenden Volummenge an Wasser aufgeschwemmt. Da die dekantierte überstehende Lösung noch eine geringe Restaktivität am suspendierten Meerschweinchendarm aufwies, also noch nicht alles gebildete DK an die Kohle adsorbiert worden war, und da nach erneutem Versetzen einer Probe dieser überstehenden Lösung mit K eine geringe Steigerung der DK-Aktivität festzustellen war, wurde die überstehende Lösung erneut mit K (25 Einheiten) versetzt und das aktivierte DK in derselben Weise wie oben an frisch zugegebene Tierkohle adsorbiert. Die von dem im Aqua dest. aufgeschwemmten Niederschlag nach 30 Min. langem Stehen abzentrifugierte und dekantierte überstehende Lösung war ziemlich klar gegenüber dem ersten Überstand, der praktisch unverändertes Serum darstellt. Es war jedoch keine Aktivität in dieser Lösung festzustellen.

γ₄) Rückgewinnung des an die Kohle adsorbierten Kallidins durch Elution mit Methanol bei Zusatz von 1% Trichloressigsäure.

Da DK ausser in Aqua dest. auch in Methanol löslich ist, wurde versucht, durch Auswaschung des verbliebenen Kohle-

rückstandes mit einer durch Zugabe von Trichloressigsäure angesäuerten Methanollösung (1%ig) das DK aus dem Kohleniederschlag zu eluieren. Dazu wurde der verbliebene Kohleniederschlag mit der doppelten der ursprünglichen Volummenge des Serums entsprechenden Menge an Methanol, im vorliegenden Fall also 200ml versetzt, das Gemisch mit 2ml 10%iger Trichloressigsäure angesäuert und nach 2-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur zentrifugiert.

Die überstehende Lösung wurde sodann dekantiert und im Vakuum unter Stickstoff bei etwa 40°C bis fast zur Trockne eingeengt. Sodann wurde der im Kolben verbliebene Rückstand mit 20ml Aqua dest. aufgeschwemmt und zur Vertreibung des restlichen Methanols erneut auf 10ml eingeengt. Die verbliebene stark saure und trübe Lösung wurde nun mit 10%iger Ammoniaklösung neutralisiert, wobei sich die Trübungen vollkommen lösten.

Die Testung dieser Lösung am suspendierten Meerschweinchendarm ergab eine sehr schöne, für DK charakteristische Aktivität. Die Elution mit Methanol wurde noch zweimal in derselben Weise wiederholt, wodurch auch das noch nach der ersten Methanolelution am Kohleniederschlag verbliebene DK eluiert werden konnte.

Ein vor der Methanolelution vorgenommener Versuch, das an Kohle adsorbierte DK durch eine 1%ige Trichloressigsäurelösung zu eluieren, führte zu keiner wesentlichen Ausbeute. Das gewonnene DK erwies sich am Darm als nur wenig aktiv, da es vermutlich durch starke Hemmsubstanzen verunreinigt war.

15) Abgrenzung der gewonnenen Kallidinlösung gegenüber anderen darmaktiven Substanzen des Serums.

Eine Abgrenzung der durch Methanolelution gewonnenen DK-Lösung ergab neben der starken Darm- und Uterusakti-

vität Beständigkeit gegenüber Säure und kurzzeitigem Kochen sowie Inaktivierbarkeit durch Inkubation mit frischem Rinderserum oder durch Versetzen der Lösung mit Lauge. Die Identität des gewonnenen Präparates mit DK erscheint damit gesichert.

16) Papierchromatographische Untersuchung des gewonnenen Präparates und weitere Reinigung der Lösung.

Papierchromatographische Untersuchung dieses Präparates ergab bei Butanol-Eisessig-Wasser (80:20:20) als Lösungsmittel und bei 24 Stunden Laufzeit im aufsteigenden Chromatogramm etwa 1-2 ninhydrinpositive Zonen von verschiedenem RF-Wert. Eine weitere Reinigung der durch Methanolelution aus der Tierkohle gewonnenen Präparate wurde durch Fällung mit Aceton versucht. Dazu wurde der DK-Lösung solange Aceton zugegeben, bis eine feinflockige weiße Trübung im Reagenzglas auftrat, die dann nach 24stündigem Stehen bei -14° abzentrifugiert werden konnte. Sie wies maximal etwa 30-40% der Ausgangsaktivität auf.

Die gewonnenen Lösungen waren wasserklar, verloren jedoch bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sehr schnell

an Aktivität. Aufbewahrung der Präparate bei 0° im Trockenzustand oder in Lösung über mehrere Wochen oder Monate war ohne wesentlichen Verlust an Aktivität möglich.

Als eine weitere, ebenso schonende Methode, DK zu gewinnen, erscheint seine Anreicherung und Isolierung auf säulenchromatographischem Wege.

8) Isolierung und Anreicherung von Kallidin aus dem Kallikrein-Serum-Inkubat durch Fraktionierung an einer Aluminiumoxydsäule.

Wie durch Vorversuche ermittelt wurde, wird DK ebenso wenig wie Kallidinogen von Aluminiumoxyd adsorbiert. Es wurden deshalb 100ml frisches Rinderserum mit 50KE und 10mg Cysteinhydrochlorid versetzt und nach 5 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur an einer Aluminiumoxydsäule fraktioniert. Um ein möglichst schnelles Eindringen und damit auch eine rasche Abtrennung des gebildeten DK von seinem Inaktivator sowie den weiteren Bestandteilen des Serums zu erreichen, wurde das Seruminkubationsgemisch an einer mit Aluminiumoxyd gefüllten Nutsche von 25cm Ø und 5cm Länge fraktioniert. Durch

die relativ große Oberfläche war das Serum-Inkubationsgemisch von 150ml innerhalb 15 Minuten vollständig in das Aluminiumoxyd eingesickert. Innerhalb dieser Zeitspanne war infolge des Cysteininzusatzes die Inaktivierung des gebildeten DK gering. Das Eluat wurde in 62 Einzelfraktionen von etwa 10ml aufgefangen. Als Elutionsmittel dienten 250ml H_2O , 250ml 0,1n HCl und 100ml 25%iger HCl. Die Testung der Eluate am isolierten Meerschweinchendarm ergab maximale Aktivität bei Rohr 40-60. Die Ausbeute an Aktivität betrug wie zu erwarten 100%; da keine Adsorption des gebildeten DK am Aluminiumoxyd erfolgt war, war auch kein ausgeprägtes Aktivitätsmaximum bei einer bestimmten Einzelfraktion festzustellen (siehe Kurve).

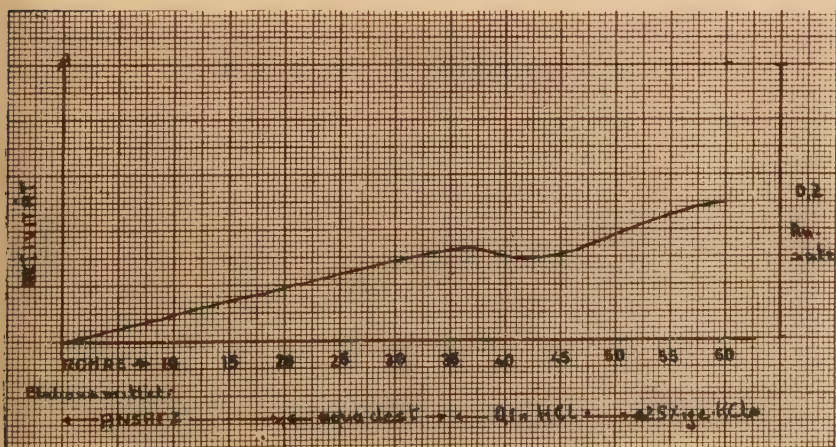


Abb: 11

Auftrennung der Aktivität eines K-Serum Inkubationsgemisches durch fraktionierte Elution aus einer Al₂O₃-Schicht

Der Reinigungs- und Anreicherungs-effekt von DK in den stark aktiven Einzelfractionen war nicht so wesentlich, daß die Aluminiumoxydfractionierung in der angegebenen Weise als Ausgangsbasis für die weitere Reinigung und Anreicherung von DK geeignet erschien.

Eine an einem 60cm langen und 18cm im $\varnothing$ aufweisenden Aluminiumoxydsäule durchgeführte Fractionierung eines Serum-K-Inkubationsgemisches führte zu ähnlichen Ergebnissen. Die Aktivität der eluierten Fractionen war ohne charakteristische Optima über das gesamte Elutionsspektrum verteilt. Es wurde deshalb versucht, die Eliminierung des DK aus dem Kallikreinserum-Inkubationsgemisch durch Fractionierung an Amberlite-Säulen zu erreichen.

b) Gewinnung von Kallidin durch Anreicherung aus einem Kallidinogen-Kallikrein-Inkubat.

Da die Fractionierung des Gesamtansatzes, wie er in den Aluminiumoxydsäulen verwendet wurde, zu einer Überlastung der Amberlite-Säulen führen würde, erschien es notwendig, auf die eingangs erwähnte zweite Möglichkeit der DK-Gewinnung zurückzugreifen, die Aktivierung einer aus Serum gewonnenen Kallidinogenlösung. Dazu wurde

frisches Rinderserum, wie bereits erwähnt, einer Fraktionierung in einer Aluminiumoxydsäule unterworfen, wodurch ein großer Teil der im Serum vorhandenen Eiweißkörper vom Kallidinogen abgetrennt werden konnte. Darüber hinaus wurde auch der DK-Inaktivatorgehalt der Lösung soweit zurückgedrängt, daß nach Inkubation mit K nach 60 Minuten noch keine Inaktivierung des gebildeten DK im Inkubationsgemisch festzustellen war. Ein Zusatz von Cystein war damit überflüssig. Das Bildungsoptimum von DK lag bei 20 Minuten nach Beginn der Inkubation.

a) Fraktionierung des Kallidinogen-Kallikrein-Inkubates an der Amberlite IR4-B-Säule mit Weiterfraktionierung der kallidinhaltigen Fraktionen an einer Amberlite IRC-50-Säule.

Versuchsbeschreibung:

Es wurden 40ml einer Kallidinogenlösung mit 20KE versetzt, 20 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und sodann an einer unvorherbehandelten Amberlite IR 4-B-Säule (14:4cm) fraktioniert. Von den aufgefangenen Eluaten (16 Einzelfraktionen von je 10ml) war Fraktion 1-4 wasserklar, Fraktion 5-11 leicht gelblich gefärbt und Fraktion

12-16 wiederum klar und durchsichtig. Eine Testung der einzelnen Fraktionen auf ihren DK-Gehalt am isolierten Meerschweinchendarm ergab einen Aktivitätsverlauf, der sich etwa parallel der unterschiedlichen Färbung der Eluate in 3 Zonen aufteilen lässt (Siehe Kurve). Fraktion 1-4 löste am isolierten Meerschweinchendarm eine nur sehr zögernd und langsam zu einem Maximum ansteigende Kontraktion aus. In ähnlicher Weise verliefen auch die durch Fraktion 12-16 losbaren Kontraktionen. Fraktion 5-11 hingegen zeigte im allgemeinen eine spontane rasch zu ihrer vollen Kontraktionshöhe ansteigende Aktivität, ähnlich wie sie für DK charakteristisch ist.

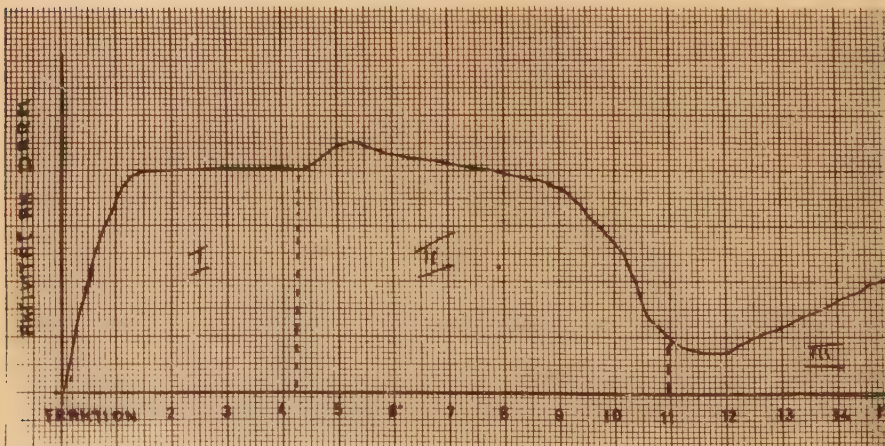


Abb: 12

Auftrennung der Aktivität eines Kallidinogen-K Inkubationsgemisches durch fraktionierte Elution aus einer Amberlite IR4-B Säule

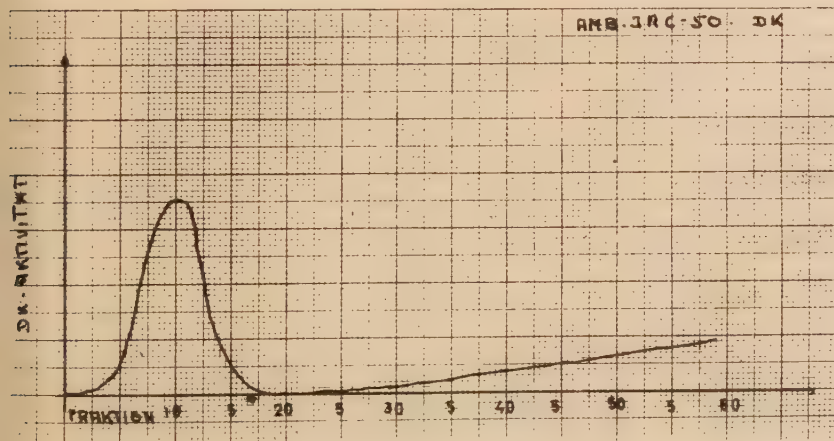
Die Fraktionierung von DK an der Amberlite IR 4-B-Säule hatte also offenbar nicht zu einer scharfen Abtrennung von DK von seinen Begleitsubstanzen geführt; es ist dies auch nicht zu erwarten, da DK aufgrund seiner basischen Natur nicht von den ebenfalls basisch aufgeladenen Amberlite IR-4-B adsorbiert wird. Es sollte nur eine Adsorption der Begleitsubstanzen an den Amberlite durch diese Reinigungsmethode erfolgen. Um eine weitere Reinigung dieser DK-Lösungen zu erreichen, wurde Fraktion 5-11 einer erneuten Fraktionierung an einer Amberlite IRC-50-Säule unterworfen. Es wurden 26 Einzelfraktionen von je 10ml aufgefangen. Fraktion 0-4 war klar und durchsichtig, Fraktion 5-8 leicht gelblich gefärbt und schwach sauer; nach Neutralisation fiel bei diesen Eluatzen ein feinflockiger weißer Niederschlag aus. Fraktion 8-24 war wiederum durchsichtig und klar. Als Elutionsmittel wurde Aqua dest. sowie 0,1n HCl und 1n HCl verwendet. Aktivitätsablauf am Darm siehe Kurve:

Es war also eine scharfe Trennung der einheitlich erscheinenden DK-Lösung in 2 Aktivitätsoptima durch diese Weiterfraktionierung erreicht worden. Ob diese beiden Aktivitätsoptima der Eluate auf 2 nicht identische Substanzen zurückzuführen sind - ihre Eluierbarkeit durch verschiedene Elutionsmittel würde darauf hinweisen - soll weiter unten zur Diskussion gestellt werden.

8) Fraktionierung eines Kallidinogen-Kallikrein-Inkubates an der Amberlite IRC-50-Säule.

Zur Fraktionierung einer DK-Lösung am Kationenaustauscher IRC-50 wurden 150ml einer in der oben angegebenen Weise hergestellten Kallidinogenlösung mit der entsprechenden Menge K versetzt und nach Ablauf der im Vorversuch ermittelten optimalen Freilegungszeit von DK durch eine Säule (8cm : 14cm) geschickt. Es wurden 56 Einzelfraktionen von je 10ml aufgefangen. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, wurde durch diese Fraktionierung von vornherein eine scharfe Trennung der aktiven Substanzen herbeigeführt. Fraktion 5-14 wies am Darm eine rasch einsetzende histaminähnliche Kontraktion auf. Die übrigen Fraktionen (30-56) führten nur zu zögernder Erregung

des isolierten Meerschweinchendarmes. Erst nach Wechsel der Badflüssigkeit war auch bei diesen Eluaten eine spontan kontrahierende Wirkung am suspendierten Meerschweinchendarm festzustellen. Die Aktivität dieser Eluate war durch Inkubation mit frischem Rinderserum nicht zu vermindern, ebensowenig wurde sie durch kurzes Aufkochen mit Säure oder Lauge vollkommen zerstört. Die Aktivität der Eluate 5-14 hingegen war durch Inkubation mit frischem Rinderserum zu inaktivieren, wenngleich die Inaktivierungszeit gegenüber einer normalen DK-Lösung auf etwa das Doppelte bis Dreifache verlängert war.



Es erhebt sich also die Frage: Wie ist diese Auftrennung der in ihrer Aktivität einheitlich erscheinenden DK-Lösung in eine Reihe mehr oder weniger stark darmaktiver

Substanzen zu erklären. Es wäre naheliegend, die einheitlich erscheinende Aktivität im Kallikrein-Kallidinogengemisch nicht auf eine einzelne Substanz - nämlich DK - sondern auf eine Reihe darmwirksamer Einzelkomponenten zurückzuführen, die durch die Fraktionierung an der Säule voneinander getrennt worden waren. Diese Erklärung erscheint wenig wahrscheinlich, wenngleich keine andere Möglichkeit bleibt, falls man nicht dem Ionenaustauschvorgang an der Amberlite-Säule, also dem Reinigungsvorgang als solchem die Rolle zudiktieren will, im K-Serum-Gemisch Reaktionen auszulösen, die zur Aktivierung darmaktiver Substanzen führen können. Es wäre dies die zweite mögliche Erklärung. Die dritte und einfachste Deutung für die verschieden erscheinenden darmaktiven Substanzen in den Eluaten liegt in der mehr oder weniger starken Aktivierung und Anreicherung von Hemmsubstanzen, denen zufolge die Art der Kontraktion am Darm nicht in der Weise ablaufen kann, wie dies z.B. im unveränderten Serum-K-Inkubations-Gemisch oder den auf andere Weise hergestellten DK-Präparaten der Fall ist.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Unverändertes Serum vom Rind enthält normalerweise eine Reihe darmaktiver Substanzen, die nach ihrer Aktivierung durch die entsprechenden Fermente oder sonstige Anreicherungsverfahren nachweisbar werden (Kallidin, Bradykinin, Serotonin usw.). Sie liegen im unveränderten Serum in ihrer inaktiven Vorstufe vor. Zur Aktivierung derartiger Substanzen scheint, wie im nachfolgenden Teil dieser Arbeit weiter auszuführen sein wird, nicht immer und unbedingt das entsprechende Ferment notwendig zu sein. Es genügt offenbar, im Serum vorhandene "Aktivatoren" durch entsprechende Eingriffe in die normale Struktur des Serums zu aktivieren und damit Reaktionen auszulösen, die, ähnlich den Fermentreaktionen, zur Aktivierung darm- und uterusaktiver Substanzen führen.

Es ist allerdings auch denkbar, daß die Aktivierung derartiger Substanzen im Serum nicht primär über die Aktivierung eines Fermentes zustandekommt, sondern daß die Zugabe der entsprechenden chemischen Reagenzien zu Serum von sich aus bereits zur Aktivierung einer derartigen Substanz führen kann. Wie weiter unten auszuführen

sein wird, ist dies allerdings wenig wahrscheinlich.

Diese Feststellungen bedeuten aber andererseits auch, daß jede Anreicherungs-methode - selbst so schonend erscheinende, wie sie die Säulenchromatographie am Ionenaustauscher darstellt - in einem Substanzgemisch Reaktionen auslösen kann, die, wenn sie übersehen werden, zu vollkommen irreführenden Schlüssen bezüglich Art und Eigenschaften der letztlich isolierten Substanz Anlass geben können. Eine Reihe der jetzt noch angewandten Anreicherungsverfahren für verschiedene darm- und uterusaktive Polypeptide aus Serum scheint diese Gefahr in sich zu bergen.

Teil III

Untersuchung der durch nicht enzymatisch wirksame Substanzen im Serum, Plasma oder einer Pseudoglobulin - fraktion auslösbaren Reaktionen.

Die im vorigen Kapitel aufgeworfene Frage, ob einzelne der zur DK- Gewinnung angewandten Reinigungsschritte zur Aktivierung darmaktiver Substanzen geführt hatten, wie sie in den Inkubationsgemischen nach der Säulenchromatographie nachweisbar wurden, oder ob diese von vornherein in aktivem Zustand in dem Serum - Inkubationsgemisch vorgelegen hatten und durch die Säulenchromatographie nur voneinander getrennt wurden, konnte zunächst nicht entschieden werden.

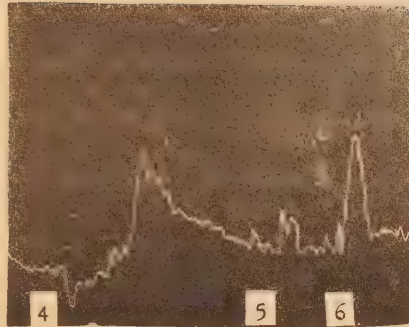
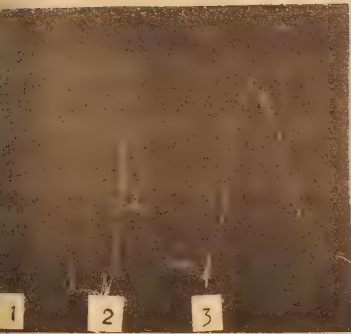
Eine Nachprüfung verschiedener chemischer Anreicherungsverfahren bzw der dazu angewandten Chemikalien auf ihre Fähigkeit, im normalen unvorherbehandelten Serum, Plasma oder einer entsprechenden Pseudoglobulinfraktion Reaktionen auszulösen, die zu darmaktiven Substanzen führen brachte folgende Ergebnisse:

A) Untersuchung der im Serum, Plasma oder einer Pseudoglobulinfraktion nach Hitzedenaturierung bei Zusatz von 50 Vol.% Säure oder Laure freigesetzten darmaktiven Substanzen.

Zu den Untersuchungen wurde im allgemeinen frisches Rinder Serum oder eine durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat daraus gewonnene Pseudoglobulinfraktion verwendet. In einigen Fällen diente auch Trockenplasmin, das in Aqua dest. 1:10 gelöst wurde, als Ausgangsmaterial.

Versuchsbeschreibung:

Frisches dialysiertes Rinder Serum, Trockenplasma oder eine entsprechende Pseudoglobulinfraktion wurden mit 50 Vol. % in H_2SO_4 versetzt und etwa 3 Min. über offener Flamme gekocht. Sodann wurde der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert und die überstehende Lösung mit NaOH neutralisiert. Sie wies besonders bei Verwendung von Trockenplasmin am isolierten und in Tyrodelösung suspendierten Meerschweinchenileum eine deutlich kontrahierende Wirkung auf. Kochen von Plasma oder Serum oder einer Pseudoglobulinfraktion mit 50 Vol.% in NaOH ergab eine ähnlich darmkontrahierende Wirkung im abzentrifugierten und neutralisierten Überstand.



o.: 14

Freisetzung darmaktiver Substanzen aus Serum, Plasma oder einer
Eudoglobulinfraktion durch Kochen mit Säure oder Lauge.

1. 0,1 einer Einheit an Wallidin. 2., 0,2ml eines Ansatzes von
Trockenplasma der mit 0,5ml 1n HCl gekocht worden war.
3. 0,2ml eines Ansatzes von 2ml Plasma mit 0,5 ml 1n NaOH gekocht.
4. 0,2ml eines Ansatzes von 2ml Rinderserum mit 0,5 ml 1n NaOH gek.
5. Eigenwirkung von 0,2ml Rinderserum.
6. 0,2ml eines Ansatzes von 2ml Rinderserum mit 0,5ml 1n HCl gek.

besonders bei Verwendung von Rinderserum zu beobachtende
gernde Kontraktionsart dürfte auf eine zusätzliche Freisetzung
von Hemmstoffen zurückzuführen sein, denen zufolge eine spontane
Kontraktion am Darm wenigstens zum Teil verhindert wird.

Pharmakologische und chemische Eigenschaften der durch Säure
oder Laugendenaturierung aus Serum gewonnenen Überstände.

Die Aktivität der abzentrifugierten und neutralisierten
Überstände erweist sich als thermostabil sowie als stabil
über 5 Minuten langem Kochen mit Säure oder Lauge.

Durch Inkubation mit frischem Rinderserum wird die darmkontrahierende Wirkung der Lösung nicht vermindert oder vermehrt. Am Blutdruck des narkotisierten Hundes ist die Lösung unwirksam.

Diskussion der Ergebnisse:

Der zu den Versuchen verwendete hohe Anteil an Säure oder Lauge bringt eine relativ hohe Konzentration an anorganischen Salzen im neutralisierten Versuchsansatz mit sich. Diese ist jedoch für die Auswertbarkeit der Lösung am isolierten Darm- oder Uteruspräparat nicht immer gleichgültig. In manchen Fällen vermag eine hohe Salzkonzentration, vermutlich infolge einer Veränderung der Ionenkonzentration der Badflüssigkeit bereits eine Kontraktion des Darm- oder Uteruspräparates herbeizuführen. Um diese Faktoren weitgehend auszuschalten erschien es notwendig, den hohen Anteil anorganischer Bestandteile im Ansatz möglichst weitgehend zu vermindern. Weiterhin erscheint auch die Denaturierung des Serums durch Kochen über offener Flamme für exakt reproduzierbare Untersuchungen ungeeignet, da der Temperaturverlauf sowie der Grad der Denaturierung des Serums nur schwer zu bestimmen und zu verfolgen ist. Besser und exakter

zu reproduzieren sind die Versuche bei Denaturierung des Serums im Thermostaten oder bei Einleiten von Wasserdampf in das Serumgemisch.

B) Untersuchung der im Serum nach Hitzedenaturierung bei Zusatz von 10% Säure ablaufenden Reaktionsvorgänge.

Versuchsbeschreibung:

Frisches dialysiertes Rinderserum oder eine entsprechende Pseudoglobulinfraktion wurde mit 10 Vol.% einer 1n H_2SO_4 -Lösung versetzt und das Gemisch durch Einleiten von Wasserdampf innerhalb möglichst kurzer Zeit auf 90° erhitzt. Nach 30 Min. bis 3 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch zentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit 1n NaOH wieder neutralisiert.



Abb.: 15 Darmaktive Wirkungen der bei 10% 1n H_2SO_4 -Zusatz nach der Hitzedenaturierung im Serum freigesetzten darmaktiven Substanzen. (Meerschweinendarm in ...)

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, weisen die durch den gleichen Versuchsansatz am isolierten Meerschweinchendarm auslösbbaren Kontraktionen je nach der seit der Denaturierung des Serums verstrichenen Zeitspanne deutliche Unterschiede auf. Der sofort nach der Denaturierung getestete Überstand wies am suspendierten Meerschweinchendarm im allgemeinen keine oder nur eine sehr geringe Aktivität auf. Wurde das Serungemisch jedoch 1-2 Stunden nach seiner Denaturierung bei Zimmertemperatur belassen und sodann zentrifugiert, so hatte der Überstand meist bereits die optimale Aktivität erreicht. Eine laufende Testung des Überstandes innerhalb der von der Denaturierung des Serums bis zu seiner Inaktivierung verstrichenen Zeitspanne ergab im allgemeinen ein Aktivitätsoptimum nach 2-3 Stunden. Nach maximal 1-2 Tagen war diese Aktivität im Überstand im allgemeinen wieder verschwunden. Der abzentrifugierte Überstand scheint also nicht nur die für seine darmkontrahierende Wirkung verantwortliche Substanz zu beinhalten, sondern darüber hinaus auch einen Aktivator bzw. Inaktivator dieser Substanz. Im Moment der Testung dieses Überstandes ist somit, je nach dem Überwiegen des Aktivierungs-

bzw. Inaktivierungsvorganges eine mehr oder weniger starke Kontraktion am suspendierten Meerschweinchendarm nachweisbar.

Eine schematische Darstellung der im Serum nach seiner Denaturierung durch Hitze + H_2SO_4 ablaufenden Reaktionen lässt einen Reaktionsablauf in folgender Weise wahrscheinlich erscheinen:

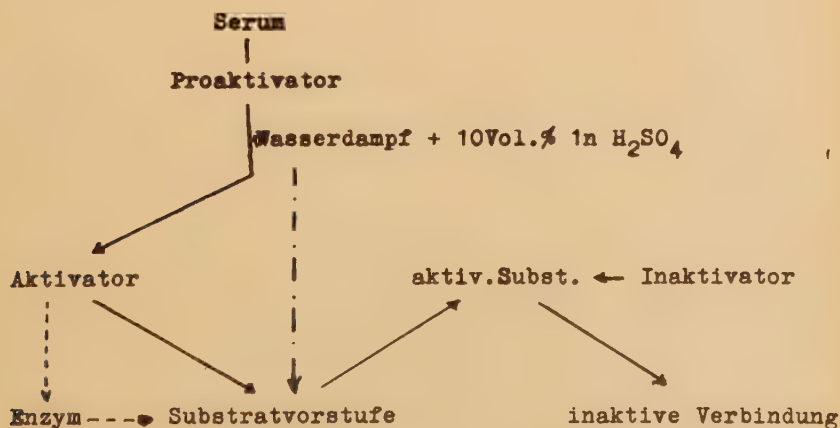


Abb.: 16
Schematische Darstellung der durch H_2SO_4 + Wasserdampf im Serum oder Plasma auslösbarer Reaktionen.

Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Proaktivator um eine Verbindung handelt, die zwar auch normalerweise im Serum vorhanden ist, jedoch in inaktiver Form, sodaß es nicht zur Aktivierung des Substrates kommt. Ob dieser Proaktivator bzw. Aktivator allerdings ein echtes Enzym darstellt, oder ob ihm lediglich die Funktion der Aktivierung eines Enzyms zukommt ist nach den bisherigen Untersuchungen nicht zu entscheiden.

Der in dem Schema angedeutete zweite Weg der Aktivierung darmaktiver Substanzen durch Direkteinwirkung des Wasserdampfes bzw. der Säure auf das Substrat ist wenig wahrscheinlich. Die nach der Denaturierung erst langsam ansteigende Aktivität in dem Überstand sowie die Steigerung der Aktivität bei Inkubation eines Überstandes mit dem entsprechenden oder einem aus einem anderen Versuch gewonnenen Niederschlag (s.u.) ist durch eine Di-reaktaktivierung nicht zu erklären. Die Inkubation eines Überstandes mit frischem Rinderserum, das ja ebenfalls inaktives Substrat enthalten müsste führt zu keiner Steigerung der Aktivität in dem Inkubationsgemisch. Es mag dies daran liegen, daß der Inaktivatorgehalt in diesem

System zu hoch ist, um eine stattfindende Aktivierung darmaktiver Substanzen sichtbar werden zu lassen. Dagegen enthält das denaturierte Serungemisch nur noch einen geringen Teil des Inaktivatorgehaltes vom Gesamtserum (der Hauptanteil wurde vermutlich durch den Denaturierungsprozess zerstört, sodaß die Inaktivierung in dem Inkubationsgemisch nur mehr relativ langsam verläuft und damit den direkten Nachweis der freigesetzten darmaktiven Substanzen ermöglicht.)

1) Chemische und pharmakologische Eigenschaften der durch Hitze + H_2SO_4 im Serum freigesetzten darmaktiven Substanzen.

Zweimalige Eintrocknung der Lösung im Thermostaten bei 90° und Wiederaufnahme in der ursprünglichen Menge Aqua dest. führte in einem Fall zu einem Verlust an Aktivität um 50% in einem anderen Fall zu vollständigem Aktivitätsverlust des Überstandes. Inkubation des Überstandes mit frischem Rinderserum brachte in jedem Fall innerhalb 5-10 Min. vollständigen Aktivitätsverlust. Gegenüber Kochen mit Säure (in H_2SO_4 5 Min. lang) erwies sich die Substanz als relativ beständig. (Aktivitätsab-

nahme um etwa 40%). 5 Minuten langes Kochen des Überstandes mit 1n NaOH führte zum vollständigen Verlust der Aktivität. Am Blutdruck eines narkotisierten Hundes war die Substanz ohne charakteristische Wirkung.

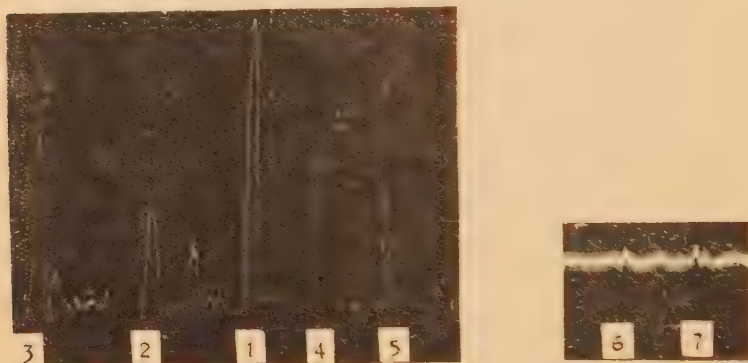


Abb.: 17

Chemische und pharmakologische Eigenschaften der durch Hitze und H_2SO_4 im Serum freigesetzten darmaktiven Substanzen. (Meerschweinchendarm in Tyrodelösung bei 37 Grad Badtemp.)

- 1., Wirksamkeit der durch Wasserdampf + H_2SO_4 im Serum freigesetzten Substanz 0,25ml.
- 2., Wirkung dieser Substanz nach Kochen mit 1n NaOH.
- 3., Wirkung dieser Substanz nach Kochen mit 1n HCl.
- 4., Wirkung von 1,0 ml dieser Substanz nach Eintrocknung im Thermostaten bei 90 Grad. 5., = 4.
- 6., Wirkung von 2,5 ml dieser Substanzlösung am Blutdruck eines narkotisierten Hundes.
- 7., Wirkung von 4ml dieser Substanz am Blutdruck desselben Tieres.

Untersuchung des nach der Denaturierung des Serums verbliebenen Rückstandes.

Der nach der Denaturierung des Serums abzentrifugierte Niederschlag wies nach Suspension in Aqua dest. am suspendierten Meerschweinchendarm keine oder nur sehr geringe Aktivität auf.

Wurde der Niederschlag mit der entsprechenden oder einer aus anderen Ansätzen gewonnenen überstehenden Lösung inkubiert, so kam es meist zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität (etwa 2-3fach gegenüber der Ausgangsaktivität). Diese Steigerung der Aktivität weist erstens darauf hin, daß durch den Denaturierungsprozess nicht die gesamte Menge der im Serum in inaktiver Form vorliegenden Substanzen aktiviert worden war und zweitens, daß auch im abzentrifugierten Niederschlag noch Verbindungen vorhanden sind, die aktivierende Eigenschaften aufweisen. Es ist aber auch der umgekehrte Weg denkbar, indem im Niederschlag lediglich weitere Substratmengen zur Verfügung gestellt werden, die durch einen Überschuss an Aktivator im Überstand aktiviert werden.

Weitere Faktoren, denen ein Einfluss in diesem System zukommen könnte, liegen in den einzelnen Denaturierungsschritten des Serums. Eine Untersuchung der Aktivitätsausbeute im Überstand in Abhängigkeit von der Art, der Dauer der Erhitzung des Serums sowie dem p_H des Inkubationsgemisches ergab folgende Ergebnisse:

Einfluss der Wasserdampfdenaturierung auf die Aktivitätsausbeute.

Wurde das mit 10Vol.% in H_2SO_4 versetzte Serum oder die entsprechende Pseudoglobulinfraktion anstelle von Wasserdampf im Thermostaten auf 90° erhitzt und 5 Min. bei dieser Temperatur belassen so wies der abzentrifugierte und neutralisierte Überstand am suspendierten Meerschweinchendarm ebenfalls eine deutlich kontrahierende Wirkung auf. Die Aktivität war im allgemeinen etwas geringer als bei den durch Wasserdampf erhitzten Gemischen.



Abb. 18: Erhitzung von Serum bei Zusatz von 10% in H_2SO_4 im Thermostaten (5 Min. 90°).

Vergleich der darmkontrahierenden Wirkung der Überstände eines im Thermostaten und eines durch Wasserdampf erhitzten Ansatzes.

1., 0,3γ Histamin 2., 0,2ml einer durch Erhitzen im Thermostaten gewonnenen Lösung. 3., 0,2ml desselben Ansatzes. 4., 0,15ml eines durch Erhitzung mit Wasserdampf gewonnenen Ansatzes. 5., 0,1ml desselben Ansatzes.

Einfluss der Dauer der Erhitzung auf die Höhe der aktivierten Substanzmenge.

In Serum - H_2SO_4 Gemisch wurde e im Thermostaten auf 90 Grad erhitzt und 1,5,5,7,9,12,15,20, und 25 Min. bei dieser Temp. gelassen. Die am suspendierten Meerschweinchendarm getesteten Ansätze wiesen, wie aus Abb.19 ersichtlich, ein Aktivitätsoptimum zwischen 10 und 15 Min. langer Erhitzungsdauer auf. In einem weiteren Versuch wurde das entsprechende Optimum bei etwa 10 Min. langer Erhitzungsdauer gefunden.

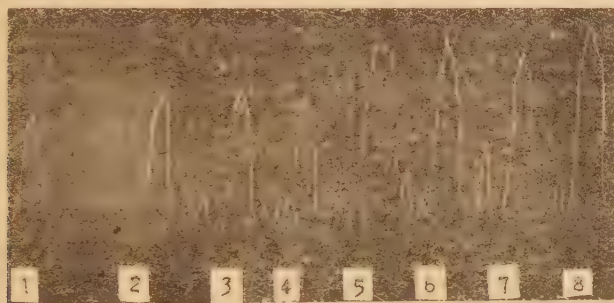


Abb.:19
 Abhängigkeit der Aktivitätsausbeute von der Dauer der Erhitzung.
 .., 0,2ml des Ansatzes nach 3 Min langer Erhitzung bei 90 Grad.
 .., 0,2ml --- 5,5" ---
 .., 0,2ml --- 7 " ---
 .., 0,2ml --- 9 " ---
 .., 0,2ml --- 12 " ---
 .., 0,2ml --- 15 " ---
 .., 0,2ml --- 20 " ---
 .., Wirkung von 0,3γ Histamin.

Abhängigkeit der Aktivitätsausbeute vom p_H des Inkubationsgemisches.

Bei den bisherigen Versuchen wurden jeweils 10% bzw 50% $1nH_2SO_4$ in manchen Fällen auch $1nHCl$) dem Serum oder Plasma

zugesetzt. Das p_H des Inkubationsgemisches lag also in jedem Fall über p_H 1. Wurde Serum 5 Min. im Thermostaten bei 90° bei neutraler Reaktion und bei p_H 6,5,4,3, 2,1, sowie bei Zusatz von 10% und 20% 1n H_2SO_4 erhitzt, so war die höchste Aktivität in dem bei neutraler Reaktion erhitzten Ansatz nachweisbar.

ein analoges Ergebnis brachte 15 Min. langes Erhitzen von Serum bei 90° im neutralen Bereich sowie bei Zusatz von 10 Vol.% 1n H_2SO_4 oder 1n NaOH. Das Aktivitätsoptimum lag auch hier bei neutraler Reaktion.

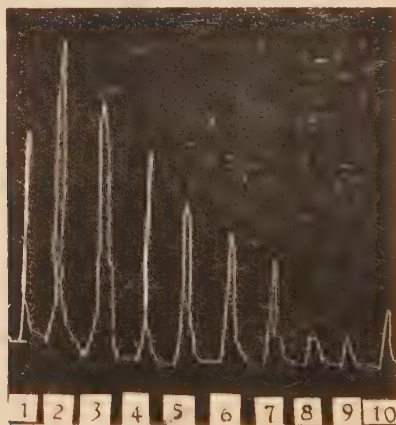


Abb. 20: 15 Min. langes Erhitzen von Serum bei p_H 7, 6, 5,4,3,2,1, sowie bei Zusatz von 10% und 20% 1n H_2SO_4 . 1., 0,1 γ Histamin. 2-8., 0,2 ml des Ansatzes bei p_H 7-1. 9., 0,2 ml eines Ansatzes bei Zusatz von 10% 1n H_2SO_4 10., " " " " 20% " " " " Aus den Untersuchungen geht hervor, daß nicht nur die

Denaturierung von Serum bei Zusatz von 10% H_2SO_4 eine darmaktive Substanz freisetzt sondern daß auch bei bloßem

Erhitzen von Serum ohne Säure- oder Laugenzusatz ein derartiger Prozess stattfindet. Es wäre denkbar, daß es durch die beiden Verfahren gemeinsame Denaturierung des Serums durch Wasserdampf zur Freisetzung ein und derselben darmaktiven Substanz kommt. Eine entsprechende Untersuchung der bei der bloßen Hitzedenaturierung im Serum freigesetzten darmaktiven Substanz ergab jedoch Unterschiede, die eine Identität der beiden darmaktiven Substanzen wenig wahrscheinlich erscheinen lassen. Die durch Erhitzen einer Pseudoglobulinfraktion (5 Min. bei 90°) in dem denaturierten Gemisch freigesetzte darmaktive Substanz wies eine Aktivität von 0,5 - 1 γ Histamin pro ml des abzentrifugierten Überstandes auf. Sie war also deutlich geringer als die bei Zusatz von H_2SO_4 erzielte Ausbeute an darmaktiver Substanz.

Eine Abhängigkeit der Höhe der Aktivitätsausbeute von der Dauer der Erhitzung konnte im Gegensatz zu dem mit H_2SO_4 erhitzten Serumgemisch nicht festgestellt werden. Die Aktivitätsausbeute blieb während 1-25 Min. langem Erhitzen des Ansatzes ziemlich konstant.

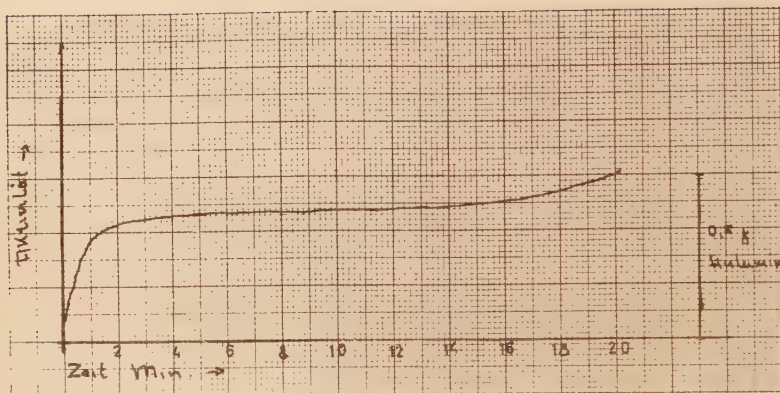


Abb.21: Einfluss der Dauer der Erhitzung einer Pseudoglobulinfraktion auf die Menge der im Überstand nachweisbaren darmaktiven Substanz. In dem Ansatz wurden 300ml einer Pseudoglobulinfraktion 1-20 Min. über offener Flamme auf 90° erhitzt. 0,1ml des abzentrifugierten Überstandes entsprachen in ihrer Wirkung am isolierten Meerschweinchendarm etwa 0,5-1 γ Histamin.

Eigenschaften der durch bloße Hitzedenaturierung im Serum freigesetzten darmaktiven Substanzen.

Zwölfstündige Dialyse des abzentrifugierten Überstandes gegen fließendes Brunnenwasser führte zum vollständigen Verschwinden der Aktivität im Innendialysat, die darmaktive Substanz ist also niedermolekular. Durch Erhitzen des Überstandes im neutralen Bereich wurde seine Aktivität nicht wesentlicher vermindert. 10 Min. langes Kochen mit 1n H_2SO_4 oder NaOH führte hingegen zum vollständigen Verlust der Aktivität. In absolutem Äthanol ist die Substanz wenig, in 80%igem Äthanol dagegen sehr

gut löslich. Ein mit frischem Rinderserum durchgeführter Inkubationsversuch, bei dem ein auf $1/8$ seines ursprünglichen Volumens eingegangener Überstand zur Inkubation verwendet wurde (Inkubation zu gleichen Teilen) führte nach 30 Min. langer Inkubationszeit zu keiner Abnahme der Aktivität in dem Inkubationsgemisch. Man könnte eher von einer Steigerung der Aktivität sprechen. Wurde der Überstand mit Kallikrein versetzt, so war bereits nach 15-20 Sek. langer Inkubationszeit keine Aktivität mehr in dem Ansatz nachweisbar. Ob es durch den Zusatz von Kallikrein zu einem spezifischen Abbau der darmaktiven Komponente gekommen war oder ob in dem Überstand nur starke Hemmsubstanzen freigesetzt worden waren, lässt sich nicht sicher entscheiden.

Die angegebenen Eigenschaften lassen die durch bloße Hitzedenaturierung gewonnene darmaktive Substanz verschieden erscheinen von der bei H_2SO_4 -Zusatz aktivierten darmaktiven Lösung.

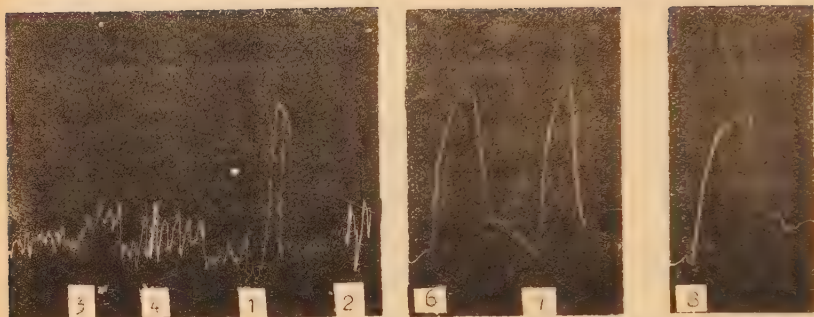


Abb.: 22

Abgrenzung der Eigenschaften der nach bloßer Hitzedenaturierung gewonnenen darmaktiven Lösung gegenüber der bei H_2SO_4 - Zusatz aktivierten Substanz.

- 1., Wirkung der durch Erhitzung gewonnenen Substanz am susp. Meerschweinchendarm.
- 2., Wirkung der Substanz nach Kochen mit 1n H_2SO_4 (5 Min.)
- 3., Wirkung der Substanz nach Kochen mit 1n $NaOH$ (5 Min.)
- 4., wie 3.,
- 6., Inkubation der Substanz mit frischem Fingerserum. (Abbauvers. 5 Min Inkubationszeit. 7., 7 Min Inkubationsz. 8., 30 Min)

Untersuchung des nach der Hitzedenaturierung des Serums abzentrifugierten Niederschlages.

Wie bereits erwähnt, ist die durch die Hitzedenaturierung des Serums gewonnene Ausbeute an darmaktiver Substanz gegenüber den bei H_2SO_4 - Zusatz erzielten Ausbeuten relativ gering. Es wäre denkbar, daß durch die bloße Hitzedenaturierung des Serums nur ein Teil der darmaktiven Substanzen aktiviert wurde, während der restliche Teil des inaktiven Substrates, soweit er nicht durch die Hitzedenaturierung zerstört worden war, sich noch in dem abzentrifugierten Niederschlag befinden müsste. Die Aufschwemmung des Niederschlages in Aqua dest. und die Testung der Suspension am isolierten Meerschweinchendarm

ergab keine Aktivität, das Substrat lag also im Niederschlag noch nicht in aktivierter Form vor. Wurde der Niederschlag jedoch erneut kurze Zeit erhitzt, so kam es zu der erwarteten Freisetzung darmaktiver Substanzen. In einem entsprechenden Versuch wurde der aus 300ml Serum verbliebene Niederschlag in 200ml Aqua dest. aufgeschwemmt und das Gemisch 15 Min. lang auf 90° erhitzt. Der abzentrifugierte Überstand wies am suspendierten Meerschweinchendarm eine etwa der beim ersten Erhitzungsversuch entsprechende Aktivität auf.

In Ergänzung zu dem oben angeführten Proaktivator-Aktivatorsystem darf also gesagt werden, daß es offenbar zur Aktivierung darmaktiver Substanzen im Serum nicht unbedingt des Zusatzes von H_2SO_4 bedarf - wenngleich der Säurezusatz zu einer weitergehenden Freisetzung darmaktiver Substanzen zu führen scheint - sondern daß bereits die einfache Hitzedenaturierung einen Reaktionsvorgang vermutlich ebenfalls nach dem oben angegebenen Schema auszulösen vermag.

Da, wie bereits erwähnt, die nach Hitzedenaturierung

im Serum freigesetzte aktive Substanz auch in Athanol löslich ist, wurde versucht, die nach der Hitzedenaturierung des Serums im Niederschlag verbliebenen darmaktiven Substanzen durch Zugabe von Athanol zu eluieren.

In einem entsprechenden Versuch wurde der nach der Hitzedenaturierung von Serum verbliebene Niederschlag mit gleicher Menge an 98%igem Athanol versetzt, das Gemisch eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen und sodann zentrifugiert. Der vom überschüssigen Athanol durch Destillation im Vakuum befreite Überstand wies nach Wiederaufnahme in Aqua dest. am suspendierten Meerschweinchen-darm eine erhebliche Eigenaktivität auf ($0,1\text{ml} = 0,1\gamma$ Histamin). Diese hohe Ausbeute an darmaktiver Substanz weist darauf hin, daß durch die Zugabe von Athanol zum Niederschlag nicht nur eine Elution sondern auch eine Aktivierung des im Niederschlag in inaktiver Form vorliegenden Substrates stattgefunden hat.

Ahnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung von 10 bzw. 20ml einer Pseudoglobulinfraktion gefunden, deren Niederschläge durch Zugabe von 90 bzw. 100ml Athanol aktiviert wurden. Die Wirkung der abzentrifugierten Über-

stände am suspendierten Meerschweinchendarm war zum Teil allerdings erheblich geringer als bei Verwendung von Serum. Durch Kochen mit Säure oder Lauge war die Aktivität der Athanoleluat rasch zu zerstören. Die Inkubation mit frischem Rinderserum ergab keine Veränderung der Aktivität. Sie unterscheidet sich damit ebenfalls wesentlich von der bei Hitze + H_2SO_4 -Denaturierung gewonnenen aktiven Lösung.

Diskussion der Ergebnisse:

Die bisher beschriebenen Eingriffe in die physiologische Struktur von Serum, wie sie die Denaturierung durch Hitze mit oder ohne Säure- oder Laugenzusatz, sowie Extraktion des abzentrifugierten Niederschlages mit Athanol darstellt, führten zur Aktivierung von Substanzen, die zum Teil gleiche, zum Teil verschiedene pharmakologische und chemische Eigenschaften aufwiesen. Es ist wenig wahrscheinlich, daß die nach den beschriebenen Verfahren beobachteten darmaktiven Wirkungen auf identische Substanzen zurückzuführen sind. Die bei der Hitzedenaturierung des Serums zu beobachtende darmaktive Wirkung bzw. die ihr zugrundeliegenden darmaktiven Verbindungen

dürften zwar auch bei Zusatz von H_2SO_4 im Serum entstehen, doch wird hier infolge der Säurelabilität der freigesetzten Substanzen ihre Aktivität zum Teil vermutlich wieder zerstört. Andererseits weist die bedeutend höhere darmaktive Wirkung der bei Hitze + H_2SO_4 -Zusatz aktivierten Substanzmenge darauf hin, daß bei diesem Verfahren zusätzlich Verbindungen aktiviert wurden, die ohne H_2SO_4 -Zusatz nicht entstehen. Die Eluier- bzw. Aktivierbarkeit weiterer darmaktiver Komponenten durch Athanolextraktion des verbliebenen Serumrückstandes läßt andererseits darauf schließen, daß durch die Hitze-denaturierungsverfahren nur ein Teil der im Serum vorhandenen darmaktiven Verbindungen aktiviert wurde.

Soweit die bisherigen Untersuchungen einen Einblick in die nach der Denaturierung im Serum stattfindenden Reaktionen erlauben, darf angenommen werden, daß die bis jetzt angewandten Denaturierungsprozesse im Serum nicht zur Aktivierung eines einzelnen spezifischen Substrates - wie dies z.B. bei den Enzymaktivatoren der Fall ist - führen, sondern daß eine Reihe von Reaktionen ausgelöst wird, deren End- oder Zwischenprodukt "zu-

fällig" die eine oder andere darmaktive Substanz darstellt. Auch die nach der Denaturierung von Serum zu beobachtende darmaktive Wirkung dürfte nicht nur auf die Wirkung einer einzelnen darmaktiven Verbindung zurückzuführen sein, sondern den Summationseffekt eines Gemisches derartiger Verbindungen darstellen. Die Art des Denaturierungsprozesses bestimmt nur, inwieweit die eine oder andere darmaktive Substanz mehr oder weniger stark in den Vordergrund tritt und damit auch die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Lösung bestimmt. Die Denaturierung von Serum durch Hitze, Säure oder Lauge führt also in einer a priori absolut unspezifischen Weise zur Freisetzung von Verbindungen, die den isolierten Meerschweinchendarm mehr oder weniger stark zu erregen vermögen.

Es bedarf keiner weiteren Erwähnung, daß darüber hinaus natürlich noch weitere Substanzen in dem Serum-Gemisch freigesetzt wurden, deren pharmakologische und chemische Eigenschaften im Rahmen dieser Untersuchungen nicht näher beobachtet wurden.

Eine Weitere Möglichkeit, im Serum unter Umgehung des fermentativen Weges darmaktive Substanzen freizusetzen,

geschieht durch Fällung mit Äthanol.

Untersuchung der durch Äthanol im Serum oder einer Pseudoglobulinfraktion auslösbaren Reaktion.

Untersuchung der durch Hitze + Äthanol in einer Pseudoglobulinfraktion aktivierten enzymatisch wirksamen Substanz.

Versuchsbeschreibung: 25ml einer Pseudoglobulinfraktion wurden mit 100ml Äthanol versetzt, das Gemisch im Wasserbad auf 60° erhitzt und 10 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Sodann wurde der Überstand von dem ausgefallenen Niederschlag durch Zentrifugation getrennt und durch 8 Stunden langes Belassen im Thermostaten bei 40° vom überschüssigen Äthanol befreit (die Vertreibung des Äthanols wurde im Thermostaten vorgenommen, da bei Einengung durch Destillation die Lösung sehr stark schäumte. Der Zusatz eines Antischäummittels - Octylalkohol z.B. - wurde wegen der hohen Empfindlichkeit der Darmpräparate für diese Substanz vermieden.

Wirkung des gewonnenen Überstandes am biologischen Testobjekt.

Der nach der Verdampfung des Äthanols verbliebene Rück-

stand wurde mit Aqua dest. auf 20ml wieder aufgefüllt. Diese Lösung wies am Darm eine geringe Eigenaktivität auf (0,5ml = 0,1γ Histamin). Am isolierten Rattenuterus war die Lösung nicht wirksam.

"Enzymatische" Aktivität der Lösung.

Wurde der eingeeengte Überstand zu gleichen Teilen mit 24-stündig dialysiertem Rinderserum inkubiert so kam es zu einer bedeutenden Steigerung der Aktivität - etwa 5-fach gegenüber der Ausgangsaktivität -. Das Optimum an Aktivität war nach 25-35 Minuten langer Inkubationsdauer festzustellen. Nach 24 Stunden waren noch 40% der optimalen Aktivität in dem Inkubationsgemisch nachweisbar.

Eigenschaften der aktivierten Verbindung.

8 Minuten langes Kochen des Inkubationsgemisches mit 50 Vol.-% 1n NaOH führte zu vollkommenem Aktivitätsverlust. Durch Kochen mit 1n H_2SO_4 wurde die Aktivität auf 30-40% vermindert. Am isolierten Rattenuterus war das Inkubationsgemisch wirksam.

Bei den weiteren Versuchen wurde Serum oder eine ent-

sprechende Globulinfraktion mit der 1-10-fachen Menge an Äthanol versetzt und der ausgefallene Niederschlag vom Überstand durch Zentrifugation getrennt.

Untersuchung der im Serum oder einer Pseudoglobulinfraktion durch Zugabe von Äthanol auslösbaren Reaktionen.

Versuchsbeschreibung: 25ml einer Pseudoglobulinfraktion wurden mit 100ml absolutem Äthanol versetzt, das Gemisch 15 Minuten unter ständigem Rühren bei Zimmertemperatur belassen und sodann zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Destillation in einer Vakuumapparatur vom Äthanol befreit und der verbliebene Rückstand mit Aqua dest. wieder auf 25ml aufgefüllt.

In ähnlicher Weise wurde auch mit frischem Rinderserum verfahren. 10-1000ml des dialysierten Serums wurden mit der 1-5-fachen Menge an Äthanol versetzt und nach 1-3 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und durch Einengung in der Vakuumapparatur vom überschüssigen Äthanol befreit. Der verbliebene Rückstand wurde sodann in 10-100 ml Aqua dest. aufgenommen und weiter verarbeitet.

Aktivität der gewonnenen Eluate am biologischen Testobjekt.

Die Wirkung dieser Äthanoleluates am isolierten Meerschweinchendarm war bei Verwendung einer Pseudoglobulinfraktion als Ausgangsmaterial relativ gering (bei einer nach der Einengung wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllten Restlösung betrug die Aktivität pro ml etwa 0,1-0,2 γ Histamin.). Wurde hingegen frisches Rinder- oder Menschenserum für die Untersuchungen verwendet, so waren etwas höhere Ausbeuten an darmaktive β Substanz zu beobachten. (1ml des auf das Ausgangsvolumen wieder aufgefüllten Äthanoleluates entsprach in seiner Wirksamkeit etwa 0,2 - 0,5 γ Histamin). Der Vergleich der Wirksamkeit der Präparate am isolierten Meerschweinchendarm mit Histamin ist nicht absolut zu werten. Es wurden Darmpräparate beobachtet, die auf Histamin normal reagierten, auf die durch Äthanol-elution aus Serum gewonnenen Präparate nicht oder nur sehr gering ansprachen.

Am isolierten Rattenuterus waren die Präparate nicht wirksam. Die darmaktiven Substanzen dürften also nicht mit Serotonin identisch sein. Am Mäusedünndarm hingegen war eine kontrahierende Wirkung nach Einbringung der Äthanol-eluate in die Badeflüssigkeit zu beobachten.

Pharmakologische und chemische Eigenschaften der durch
Athanoelution aus Serum gewonnenen darmaktiven Substanzen.

10 Minuten langes Erhitzen der eingeengten Athanoeluate brachte keine Verminderung der Aktivität. Ebenso war nach 10 Minuten langem Kochen mit Säure oder Lauge (50Vol.-% in HCl bzw. in NaOH) keine Zerstörung der darmaktiven Wirkung zu beobachten.

Zugabe von frischem Rinderserum zu den Athanoeluateten führte zu widersprechenden Ergebnissen. Einige Präparate waren innerhalb kurzer Zeit (1-10 Minuten) bei einem Inkubationsverhältnis 1:1 vollkommen zu inaktivieren, während aus anderen Chargen gewonnene Präparate auch noch nach 2 Stunden langer Inkubationsdauer nicht oder kaum abgebaut waren. Es ist nicht geklärt, worauf diese verschiedenartige Inaktivierbarkeit der einzelnen Präparate beruht. Auch die Beständigkeit der einzelnen Präparate wechselte sehr stark. Manche Chargen zeigten bei 24-stündiger Aufbewahrung im Eisschrank selbst unter Toluol einen Verlust an Aktivität bis zu 50%, während andere wieder 2-3 Wochen unverändert beständig waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß die bis jetzt geschilderten Eigenschaften der darmaktiven Verbindungen

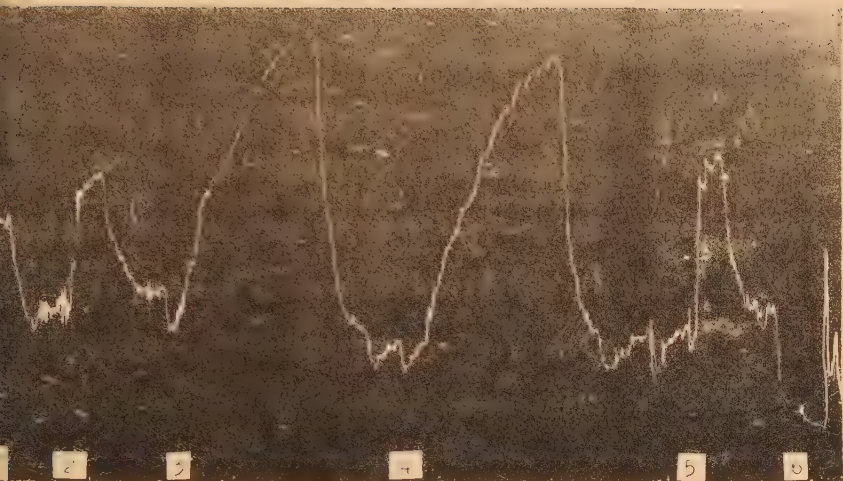


Abb. 23

Enzymatische Aktivität eines bei Athanolzusatz auf 60 Grad erhitzten Pseudoglobulinansatzes. (Eingeenerter Überstand)
 1., 0,5 ml des Überstandes. 2., 1,0 ml eines Ansatzes von 0,5 ml Überstand + 0,5 ml Rinderserum nach 8 Min langer Inkubationszeit.
 3., 1,0 ml dieses Ansatzes nach 40 Min langer Inkubationszeit.
 4., 1,0 ml --- " --- 60 Min --- " ---
 5., 1,0 ml --- " --- 190 Min --- " ---
 6., 1,0 ml dieses Ansatzes nach Kochen mit 1n NaOH. (5 Min)

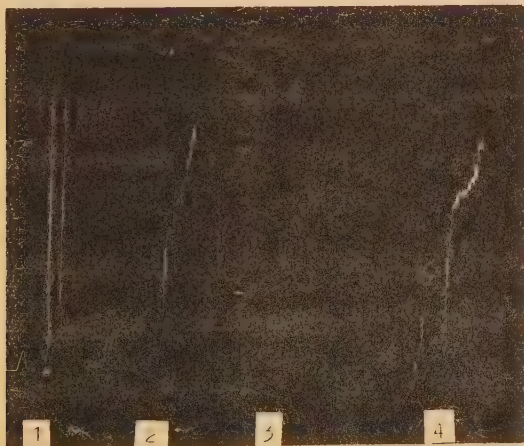


Abb. 24
 Säure- und Laugenbeständigkeit der durch Athanolelution aus Serum gewonnenen darmaktiven Substanz.
 1., Eigenwirkung von 0,5 ml der Lösung. 2., "irkung nach 5 Min langem Kochen mit 1n HCl. 3., "irkung nach 5 Min langem Kochen mit 1n NaOH. 4., "irkung nach 10 Min langem Kochen der Lösung

sie mit keiner der bekannten Substanzen identisch erscheinen lassen. Darmaktive Polypeptide , wie z.B. Kallidin oder Bradykinin kommen wegen ihrer hohen Laugeempfindlichkeit nicht in Betracht. Darüber hinaus sind aus einem mit Kallikrein vorinkubierten Serum (20ml + 40 KE) genau so hohe Aktivitätsausbeuten durch Athanolelution zu gewinnen wie aus unverändertem Serum. Der Kallidinogengehalt des Serums ist also nicht wesentlich an der Freilegung der oben beschriebenen darmaktiven Substanz beteiligt. Andere Substanzen wie Histamin, Acetylcholin oder dergl. kommen einmal wegen ihrer Nichtaktivität am isolierten Mäusedünndarm und zum anderen wegen ihrer geringen Beständigkeit gegenüber Kochen mit Säure oder Lauge nicht in Betracht. Gegenüber Histamin konnte die Substanz darüber hinaus durch Antistin abgegrenzt werden. Ihre Wirkung am suspendierten Meerschweinchendarm wird durch diese Droge nicht gehemmt.

Reinigung und weitere Anreicherung der durch Äthanol-
elution aus Serum freigelegten darmaktiven Substanz.

Elution des abzentrifugierten Überstandes mit Athanol.

Ein aus 400ml Serum, das mit gleicher Menge an absolutem

Athanol versetzt worden war abzentrifugierter Überstand wurde durch Destillation in der Vakuumapparatur bis fast zur Trockne eingeengt und der Rückstand sodann erneut mit 50ml absolutem Athanol extrahiert. Dieser Athanolextrakt wurde wiederum durch Destillation im Vakuum vom überschüssigen Athanol befreit und der Rückstand in 20-25ml Aqua dest. gelöst. Die darmkontrahierende Wirkung dieser klaren, manchmal leicht gelblich gefärbten Lösung wies am suspendierten Meerschweinchendarm pro ml eine Aktivität auf, die etwa 10-20% Histamin entsprach. Die weitere Reinigung und Anreicherung der Substanz erfolgte durch Ausschüttelung der Lösung mit der gleichen Volumenmenge Äther. Nach der Phasentrennung wurde die obere leicht gelblich gefärbte organische Phase abgesaugt und verworfen. Sie erwies sich als inaktiv am isolierten Meerschweinchendarm. Die untere weißlich grüne Phase wurde durch geringes Erwärmen im Wasserbad von Äther befreit. Eine Testung am isolierten Meerschweinchendarm ergab keinen Verlust an Aktivität gegenüber der Ausgangslösung. Zur weiteren Reinigung wurde diese Lösung mit derselben Volumenmenge an n-Butanol versetzt, einige Male geschüttelt und die Phasentrennung abgewar-

wartet. Die obere Phase wurde verworfen und die untere Phase durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther von Butanol und durch geringes Erwärmen in Wasserbad vom restlichen Äthanol befreit. Die erhaltene Lösung war nunmehr wasserklar, am suspendierten Meerschweinchendarm und Mäusedünndarm führte sie zu einer spontanen leicht auswaschbaren Kontraktion. Am Blutdruck eines narkotisierten Hundes war keine charakteristische Wirkung nach i.v. Injektion der Lösung zu beobachten. Kochen mit Säure oder Lauge führte zu keiner wesentlichen Verminderung der Aktivität. Durch Inkubation mit frischem Rinderserum war die Aktivität der Lösung nicht zu vermindern. Diese Kriterien lassen sie mit keiner der bisher bekannten Substanzen identisch erscheinen. Andererseits dürfte sie jedoch identisch sein mit der im Rohpräparat nachgewiesenen darmaktiven Substanz.

Gewinnung einer darmaktiven Substanz aus dem nach der Äthanol-fällung des Serums verbliebenen Niederschlag
durch Elution mit Aceton.

Der nach den Äthanol-fällungen verbliebene Niederschlag wurde mit gleicher Volumenmenge Aceton versetzt und unter ständigem Rühren 1 Stunde bei Zimmertemperatur be-

lassen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand
dekantiert und in einer Vakuumapparatur bis fast zur
Trockne eingengt. Der Rückstand wurde sodann mit 10-100ml
Aqua dest. aufgenommen und am isolierten Meerschweinchen-
darm getestet. Er wies in manchen Fällen eine bedeutend
höhere Aktivität auf als das erste Äthanoletuat des Serums
In anderen Fällen wieder war die erhaltene Aktivität re-
lativ gering.

Durch mehrmaliges Ausschütteln der Lösung mit Äther und
Butanol wurde, ähnlich wie oben beschrieben, letztlich
eine wasserklare stark darmaktive Lösung erhalten. Sie
unterschied sich in ihren Eigenschaften nicht von denen
durch Äthanoletution darmaktiven Lösungen, darf also als
identisch mit diesen angesehen werden.



Abb:25
Darmaktive Wirkung der durch Behandlung mit Äther und Butanol
gereinigten Fraktionen.

1., 0,2 ml der gereinigten Lösung 2., 0,2ml derselben Lösung
3., 0,5= Histamin. 4., Eigenwirkung von 0,2 ml Serum.
5-9., Inkubation der Lösung mit frischem Rinder Serum (1,2.5, u. 0.5 ml)

Untersuchung der Aktivatorwirkung der durch Äthanolelution aus Serum gewonnenen darmaktiven Lösung.

Wie bereits oben erwähnt weisen die durch Äthanol-fällung des Serums oder einer Pseudoglobulinfraktion gewonnenen darmaktiven Lösungen auch eine zum Teil erhebliche "enzymatische Aktivität auf. Diese Enzymwirkung ist allerdings wohl kaum auf ein echtes Enzym zurückzuführen sondern eher auf einen Aktivator eines Enzyms das normalerweise im Serum in einer inaktiven Form vorliegt.

Inkubation von Äthanoleluaten mit frischem Rinderserum führte in den meisten Fällen zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität am isolierten Meerschweinchendarm. Das hierbei entwickelte Aktivitätsoptimum betrug etwa das 2 - 3 fache der Eigenaktivität des Inkubationsgemisches. Bei Inkubation von Serum mit Fluaten, die durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther und Butanol gereinigt worden waren, war jedoch keine Aktivitätssteigerung mehr nachweisbar, die "enzymatisch wirksame Substanz war also offenbar von der darmaktiven Substanz weitgehend abgetrennt worden. Andererseits war auch bei Inkubation eines Überstandes mit einem entsprechenden oder aus einem anderen Versuchsansatz gewonnenen Niederschlag eine deutliche Aktivitätssteigerung am isolierten Meerschweinchendarm zu beobachten. Der Niederschlag selbst war Suspension in Aqua dest am isolierten Meerschweinchendarm unwirksam. Ebenso zeigten die Seren im allgemeinen keine oder nur sehr geringe Eigenwirkung am Darm. Diese Aktivitätsentwicklung weist darauf hin, daß ähnlich wie bei den nach Hitze + H_2SO_4 gewonnenen

Überständen auch durch Äthanol eine enzymatisch wirksame Substanz durch Fällung des Serums mit Äthanol freigesetzt wird.

Nach der heutigen Kenntniß solcher Aktivierungsvorgänge kann man folgenden Entstehungsweg annehmen.

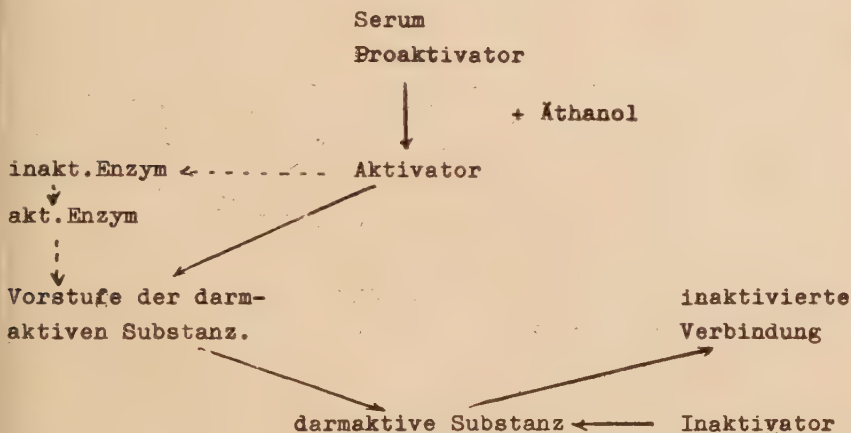


Abb.:26

Schematisch Darstellung der im Serum nach Äthanofällung ablaufenden Reaktionsvorgänge.

Die als "Aktivator" bezeichnete Substanz erwist sich als wenig temperaturempfindlich(10 Minuten langes Erhitzen im Wasserbad auf 60 Grad wird vertragen!) jedoch als sehr empfindlich gegenüber Kochen mit Säure oder Lauge.

Damit unterscheidet sich dieser Aktivator deutlich von dem durch Hitze + H_2SO_4 im Serum freigelegten "Aktivator".

Untersuchung der inaktiven Vorstufe im Serum.

Die Vorstufe der durch die Äthanol-fällung im Serum oder Plasma freigelegten darmaktiven Substanzen erweist sich als relativ beständig gegenüber Säure (ein pH von 3,9 wird ohne Aktivitätsverlust 30 Minuten bei Zimmertemperatur vertragen). Gegenüber Lauge ist diese Vorstufe jedoch sehr empfindlich.

Untersuchung der aktiven Substanz.

Die nach Inkubation eines durch Fällung von Serum oder Plasma mit abs. Äthanol gewonnenen Überstandes oder auch Niederschlages mit frischem Rinderserum entwickelte darmaktive Substanz erweist sich als thermostabil aber empfindlich gegenüber Kochen mit Säure oder Lauge. (10 Minuten langes Kochen des Inkubationsgemisches mit 50 Vol.-% 1n NaOH oder 1n HCl führte zu vollständigem Aktivitätsverlust).

Am Blutdruck eines narkotisierten Hundes war das Inkubationsgemisch nicht wirksam.

Untersuchung des Inaktivators im Serum.

Die meist nach 2 - 3 stündiger Inkubationsdauer zu beobachtende vollständige Abnahme der darmkontrahierenden Wirkung im Inkubationsgemisch läßt darauf schließen, daß in dem jeweiligen System ein spezifischer Inaktivator der gebildeten darmaktiven Substanz vorhanden ist. Es dürfte sich bei diesem Inaktivator um eine hochmolekulare und thermolabile Substanz handeln.

Die Eingliederung der Gesamtheit der genannten Vorgänge in die übrigen der bis jetzt bekannten Reaktionsvorgänge im Serum die zu darmaktiven Substanzen führen, wurde am Schluß dieses Kapitels in einer schematischen Übersichtsskizze versucht. Wie in dieser Skizze dargelegt wurde, dürften die durch nicht enzymatisch wirksame Substanzen im Serum oder Plasma freigelegten darmaktiven Verbindungen den bekannten auf enzymatischem Wege freigelegten Substanzen wie Kallidin oder Bradykinin oder auch Kinin zuzuordnen sein.

Zusammenfassung:

Denaturiert man Serum, Plasma, Vollblut oder auch eine entsprechende Pseudoglobulinfraktion durch Hitze, Versetzen mit Säuren (H_2SO_4 oder HCl) oder Lauge ($NaOH$), Äthanol, Aceton usw., so kommt es, ähnlich wie bei Zugabe gewisser proteolytischer Enzyme im Serum zur Freisetzung von Substanzen, die den isolierten und in Tyrodelösung suspendierten Meeresschweinchendarm oder Rattenuterus zur Kontraktion zu ermöglichen. Diese aktivierten Substanzen dürften, soweit ihre Abgrenzung bisher möglich war, der Reihe der bekannten die flache Muskulatur erregenden Polypeptide des Blutes, wie z.B. Kallidin, Bradykinin, Kinin, Clostridin, Pain producing substance und auch Substanzen, die entstehen, wenn Plasma mit Wasser verdünnt wird (Schachter 1956) oder wenn Plasma in Kontakt mit Glas kommt (Armstrong u.a. 1954) zuzuordnen sein.

Die durch die einzelnen Verfahren aktivierten Substanzen sind am günstigsten in den abzentrifugierten Überständen der Ansätze nachweisbar und daraus zu isolieren. Ihre chemischen und z.T. auch ihre pharmakologischen Eigenschaften lassen erkennen, daß durch oben genannte Denaturierungsprozesse nicht identische sondern je nach Art des Verfahrens jeweils voneinander verschiedene Substanzen aus dem Serum oder ihren Fraktionen freigelegt werden.

Denaturierung von Serum durch Zugabe von 10 Vol% 1n H_2SO_4 und Einleiten von Wasserdampf in das Reaktionsgemisch führt z.B. zur Entstehung einer darmaktiven Substanz, die thermostabil sowie weitgehend beständig ist gegenüber Säuren oder Laugen. Bei Inkubation mit frischem Rinderserum wird diese Substanz innerhalb kurzer Zeit inaktiviert. Denaturierung von Serum durch Hitze (10 Minuten 90°) allein führt zur Entstehung einer Substanz, die bei Inkubation mit frischem Serum nicht inaktiviert wird und gegenüber Säure oder Lauge bedeutend beständiger ist als die bei Denaturierung mit Säure und Wasserdampf gewonnene Substanz. Versetzen von Serum mit Äthanol (1:10 V/V) führt zur Aktivierung einer weiteren darmaktiven Verbindung. Diese ist thermostabil sowie beständig gegenüber Kochen mit Säure oder Lauge, wird aber bei Inkubation mit frischem Rinderserum nicht inaktiviert. Gegen Histamin konnte diese Substanz mit Antistin abgegrenzt werden. Am Blutdruck eines narkotisierten Hundes ist sie ohne charakteristische Wirkung. Die Freisetzung der einzelnen darmaktiven Substanzen dürfte jedoch nicht, wie aus dem bisher Gesagten angenommen werden könnte, allein durch den physikalischen Einwirkungsprozeß als solchen

etwa im Sinn einer hydrolytischen Spaltung oder dgl. - zustandekommen, sondern es dürfte sich bei diesen Prozessen, ähnlich wie bei anderen derartigen Reaktionen letzten Endes ebenfalls um eine enzymatische Reaktion handeln.

Es geht dies einmal daraus hervor, daß die Wirksamkeit des denaturierten Serumgemisches am suspendierten Meerschweinchen-darm nicht sofort nach dem Denaturierungsprozeß als solchem in ihrer vollen Höhe nachweisbar ist, sondern daß sie erst im Laufe der nächsten 1 bis 2 Stunden ihr Aktivitätsoptimum erreicht. In manchen Fällen konnte sogar eine vollständige Unwirksamkeit des Denaturierungsgemisches bzw. des entsprechenden Überstandes sofort nach dem Denaturierungsprozeß beobachtet werden, der dann erst im Verlaufe mehrerer Stunden ein entsprechendes Aktivitätsoptimum folgte. Dies bedeutet, daß es durch die Denaturierung des Serums zunächst zur Freilegung eines Aktivators, möglicherweise auch direkt zur Aktivierung eines entsprechenden serumeigenen Enzyms gekommen sein muß, das dann erst seinerseits die entsprechende darmaktive Substanz aus ihrer Vorstufe freilegt.

Der direkte Nachweis dieser enzymatisch wirksamen Substanz wurde durch folgende Untersuchungen erbracht. Wurde der nach Äthanol- oder auch Säurefällung von Serum abzentrifugierte Niederschlag mit frischem Rinderserum inkubiert, so war in dem Inkubationsgemisch eine bedeutende Freilegung darmaktiver Substanzen zu beobachten. Der Niederschlag als solcher war am suspendierten Meerschweinchendarm nicht aktiv. Aber nicht nur

durch Inkubation eines derartigen Niederschlages mit frischem Serum, auch bei Inkubation eines Niederschlages oder auch eines Überstandes mit einem in oben genannter Weise denaturiertem Serum kommt es zur Freisetzung darmaktiver Substanzen. Diese enzymatisch wirksame Substanz kann bei entsprechender Vorbehandlung des Serums auch im Überstand nachgewiesen werden und daraus isoliert werden.

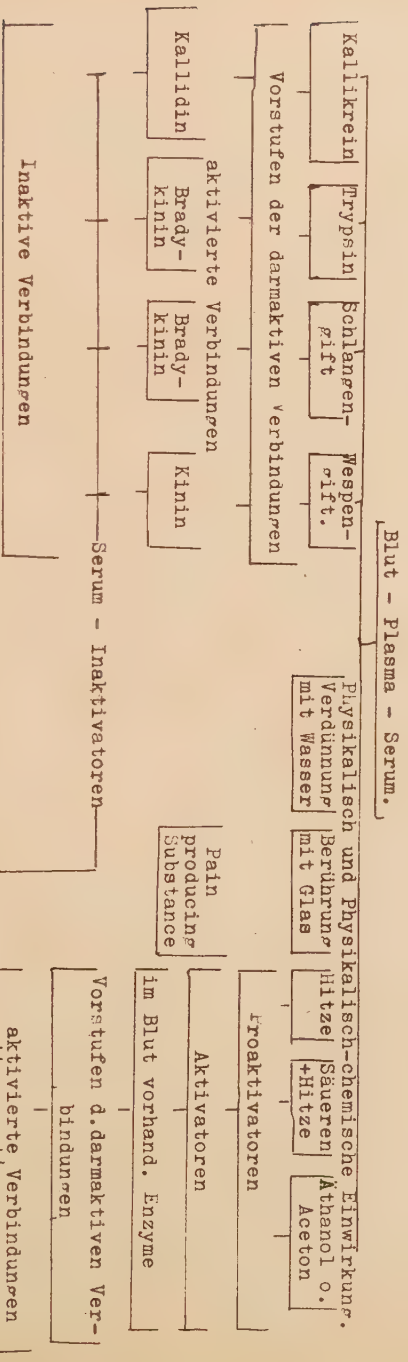
Aus dem Gesagten ergibt sich, daß der wahrscheinliche Reaktionsweg, der nach der Denaturierung der einzelnen Seren zur Aktivierung der entsprechenden darmaktiven Substanzen führt in folgender Weise abläuft.

Serum - Proaktivator Denaturierung → Aktivator →
Enzym → Vorstufe der darmaktiven Substanz →
darmaktive Substanz ← Inaktivator → inaktive Verbindung

Übersicht über die im Blut nachweisbaren darmaktiven Verbindungen.

a., durch Enzyme aktivierbare Verbindungen.

b., durch physikalisch und physikalisch-chemische Einwirkung auf Blut aktivierbare Verbindungen.



Anm. In den Formelementen des Blutes nachweisbare Substanzen wie z.B. Serotonin oder auch andere im Blut nachweisbare darmerregende Verbindungen wie Histamin oder dgl. wurden

Gesamtzusammenfassung:

Kallikrein, eine blutdrucksenkende sowie auf bestimmte Proteine des Serums proteolytisch wirksame Substanz, wurde 1929 von E.K. Frey und Kraut im Urin und später auch im Pankreas, den Speicheldrüsen sowie im Blut und Kot nachgewiesen. Diese Organverteilung sowie das bevorzugte Vorkommen von Kallikrein bei Fleischfressern läßt vermuten, daß Kallikrein bei der Aufnahme und Verwertung der Eiweiß- bzw. Fettahrung eine Bedeutung zukommt. Welcher Art in diesem Zusammenhang die Funktion von Kallikrein sein soll, kann nur als Hypothese dargestellt werden. Der Weg, den Kallikrein im Organismus von seiner Bildung bis zu seiner Ausscheidung durchläuft, ist bis jetzt experimentell nur lückenhaft belegt. Immerhin darf angenommen werden, daß von den genannten Organen in erster Linie dem Pankreas sowie den Speicheldrüsen die Funktion der Bildung von Kallikrein zukommt. Von hier gelangt das Kallikrein in den Magen-Darmtraktus, wo es zum geringen Teil mit dem Kot unverändert ausgeschieden wird. Das Schicksal des restlichen Teiles am Kallikrein ist nicht geklärt. Eine Zersetzung durch Bakterien ist nicht ausgeschlossen, aber wenig wahrscheinlich. Andererseits sind im Blut erhebliche Mengen an Kallikrein nachweisbar, ohne daß irgendwelche Anhaltspunkte für ein entsprechendes Quellgebiet vorliegen. Für eine direkte innersekretorische Ausschüttung von Kallikrein aus den entsprechenden Organen gibt es bisher keine direkten Beweise. Aus dem Blut, in dem Kallikrein in inaktiver Form kreist, wird es sodann durch die Nieren ausgeschieden. Diese Ausscheidung, die im gesunden Organismus im allgemeinen nur wenig um einen individuellen Mittelwert schwankt (0,5 KE/ml), ist bei pathologischen Stoffwechselzuständen z.T. erheblich vermindert. So wurden vor allem bei Erkrankungen der Nieren Werte von $1/4$ bis $1/20$ der Norm beobachtet. Von weiteren Erkrankungen wurden besonders Störungen des innersekretorischen Systems untersucht. Dabei ergaben sich eine Reihe von Wechselbeziehungen zu den einzelnen Drüsen. Erkrankungen des Inselapparates bei Diabetis ergaben z.B. im allgemeinen eine Verminderung der Kallikreinausscheidung auf $1/5$ - $1/10$ der Norm. Verabreichung von

Insulin führte zur Normalisierung der Kallikreinausscheidung. Andererseits brachte Zufuhr von Kallikrein bei Diabetiskranken in manchen Fällen erhebliche Besserung des Krankheitsbildes mit sich. Erkrankungen der Hypophyse waren im allgemeinen nur von einer geringen Veränderung der Kallikreinausscheidung begleitet, obwohl Verabreichung von ACTH eine deutliche Vermehrung von Kallikrein im Urin zur Folge hatte. Erkrankungen der Nebennieren (Morbus Addison) führten ebenfalls zu einer Veränderung der Kallikreinausscheidung. Andererseits führte Verabreichung von Nebennieren- Rindensteroiden (Cortison u.a.) zu geringer Vermehrung der Ausscheidungsquote. Schilddrüsenerkrankungen sowie Störungen der Keimdrüsensfunktion ließen Veränderungen des Kallikreinhaushaltes erkennen, wenngleich hier die Verhältnisse nicht so übersichtlich zu liegen scheinen wie bei den Störungen der übrigen innersekretorischen Drüsen. Die genannten Beziehungen wurden in einer Skizze schematisch dargestellt.

Eine der bekanntesten Eigenschaften von Kallikrein ist seine Wirkung auf den Blutdruck. Intravenöse Injektion von Kallikrein führt zu kurzdauerndem steilen Abfall des allgemeinen Blutdruckes sowie einer momentanen Dezentralisation des Kreislaufs. (Dauer 1-2 Minuten). Langdauernde forcierte Verabreichung von Kallikrein hingegen führt offenbar zu einer stärkeren Durchblutung des Splanchnicusgebietes einschließlich der Nebennieren und der Hypophyse und nur geringer aber anhaltender Senkung des allgemeinen Blutdruckes (Dauer Stunden bis Tage). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Veränderungen der Wirksamkeit von Kallikrein besonders bei Verschiebung der vegetativen Stoffwechsellage eines Organismus festzustellen sind. Parasympaticomimetica wie Prostigmin oder Physostigmin, aber auch Sympaticolytica wie Dibenamin oder Aldergin verstärken die Blutdrucksenkende Wirkung von Kallikrein z.T. erheblich. Umgekehrt wurden durch Sympatocomimetica und hier insbesondere durch Adrenalin die Blutdruckwirkungen von Kallikrein deutlich abgeschwächt bzw. aufgehoben. Atropin

hingegen ist ohne sicheren Einfluß auf die Kallikreinwirkung.

Da sicher angenommen werden darf, daß ein Teil der vielfältigen Wirkungen von Kallikrein auf seine Fähigkeit zurückzuführen ist aus den α_2 Globulinfraktionen des Serums eine blutdrucksenkende sowie die glatte Muskulatur erregende Substanz - Kallidin genannt - freizulegen, wurde in den folgenden Untersuchungen diesem Vorgang besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Versetzt man Serum, Plasma oder eine Pseudoglobulinfraktion (etwa 2 ml) mit Kallikrein (1 Einheit), so wird in dem Inkubationsgemisch Kallidin bis zu einer optimalen Konzentration freigesetzt. Dieses Optimum ist im Durchschnitt nach 1-5 Minuten, je nach Art des verwendeten Serums oder Plasmas, erreicht. Danach erfolgt wieder ein langsamer Abfall der in dem Inkubationsgemisch nachweisbaren Kallidinmenge. Meist ist nach 15-20 Minuten in dem Inkubationsgemisch keine Darmerregung mehr nachweisbar, das gebildete Kallidin wurde inaktiviert. Es laufen also mindestens 3 Reaktionsvorgänge in dem Inkubationsgemisch nebeneinander ab: 1. Aktivierung von Kallidinogen zu Kallidin. 2. Inaktivierung des gebildeten Kallidins. 3. Inaktivierung des zugesetzten Kallikreins.

Kallidin ist in seiner inaktiven Vorstufe im allgemeinen nur im Serum oder Blut der Säugetiere in einer mehr oder weniger hohen Konzentration nachweisbar. Andere Organe enthalten wenig oder kein Kallidinogen.

Der Versuch einer Anreicherung von Kallidinogen durch selektive Adsorption aus Plasma an Aluminiumoxyd, Fullererde, Permutit, Bleiherde u.a. und nachfolgende Elution führte zu keinen wesentlichen Erfolgen. Das Kallidinogen wurde entweder zu stark oder zu wenig an das jeweilige Adsorptionsmittel gebunden. Bessere Erfolge wurden erreicht durch fraktionierte Fällung von Plasma. Fällung von Rinderplasma mit einer 0,25%igen Kaseinlösung bei 0° und pH 4,6-4,7 brachte gute Ausbeuten an Kallidinogen. Der abzentrifugierte Niederschlag wies z.T. einen Kallidinogengehalt von 100 bis 300 % gegenüber der Ausgangslösung auf. Trotzdem erscheint diese Methode zur Kallidinogengewinnung nicht geeignet, da die gewonnenen Lösungen erhebliche

sensibilisierende und auch toxische Wirkungen auf den suspendierten Meerschweinchendarm ausübten.

Eine fraktionierte Fällung von Plasma mit Ammonsulfat ergab bei relativ geringen Substanzverlusten hohe Kallidinogenkonzentrationen in den bei 25-30%iger Sättigung gewonnenen Niederschlägen. Nach 2- bis 3-tägiger Dialyse gegen fließendes Brunnenwasser wurden die in Wasser aufgeschwemmten Niederschläge einer Fraktionierung in einer Aluminiumoxydsäule unterworfen, wodurch eine 4- bis 6-fache Anreicherung von Kallidinogen gegenüber dem Serum erzielt werden konnte. Das organische Trockengewicht der Lösung betrug bei gleichem Kallidinogengehalt im Durchschnitt 20 mg/ml gegenüber etwa 91 mg/ml des Plasmas.

Eine direkte Fraktionierung von Plasma in einer Aluminiumoxydsäule führte ebenfalls ohne allzu hohe Verluste (ca. 40 %) zu einer relativ reinen Kallidinogenlösung. Bei gleicher Aktivität war eine Anreicherung auf das 2- bis 3-fache gegenüber dem Ausgangspräparat erzielt worden.

Das bereits zu Kallidin aktivierte Kallidinogen ist als niedermolekulare und weitgehend thermostabile sowie säurebeständige Substanz bedeutend weniger empfindlich als seine Vorstufe. Die Anreicherung und Gewinnung von Kallidin aus Blut erfolgte im wesentlichen durch 3 Verfahren. In Serum, Plasma oder auch einer auf die oben angegebene Weise vorgereinigten Kallidinogenfraktion wurde durch Zusatz von Kallikrein das vorhandene Kallidinogen zu Kallidin aktiviert. Um die diesem Vorgang parallel verlaufende Inaktivierung von Kallidin möglichst hintanzuhalten, war es notwendig, den Kallidin²inaktivator entweder durch Zusatz von Cystein zu hemmen oder aber ihn durch Ansäuern bis pH 4 zu zerstören. Aus diesem so vorbereiteten Inkubationsgemisch wurde das Kallidin durch zweimal 24-stündige Dialyse gegen die 10fache Volumenmenge an aqua dest ausdialysiert. Die Außendialysate wurden sodann vereinigt und in einer Vakuumapparatur auf etwa 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt. Die erhaltene bräunlich-grüne Flüssigkeit war in ihrem Gesamtkallidingehalt um etwa 40-60 % gegenüber dem Ansatz vermindert. Das Trockengewicht der Lösung betrug 45 mg/Einheit an Kallidin (eine Einheit an Kallidin ist in ihrer Aktivität am

suspendierten und atropinisierten Meerschweinchendarm etwa der von 10 μ Histamin vergleichbar). Die weitere Reinigung und Anreicherung dieses Kallidinrohpräparates erfolgte durch Gegenstromverteilung an 8, bzw. 16 Rohren in einem zweiphasischen Medium von Butanol und Wasser. In den am stärksten aktiven Rohren war eine Anreicherung auf das 4-5fache erzielt worden. Eine papierchromatographische Untersuchung dieser reinsten Fraktionen ergab 2 - 3 Ninhydrin positive Zonen bei 24-stündiger Laufzeit in Butanol-Eisessig-Wasser als Lösungsmittel. Eine Wiederelution aus dem Papierchromatogramm erwies sich als zu verlustreich, um damit eine weitere Anreicherung erzielen zu können. Die gewonnenen Präparate waren ziemlich stabil bei Aufbewahrung unter 0 Grad, verloren jedoch sehr schnell an Aktivität bei Zimmertemperatur. Eine weitere Reinigung der Präparate wurde durch Fällung der Lösungen mit der 1-5 fachen Menge an Aceton oder Methanol erreicht. Letztlich erscheint jedoch diese Methode der Kallidingewinnung infolge der zu zahlreichen hintereinander geschalteten Reinigungsschritte als zu verlustreich, um dadurch größere Mengen an Kallidin gewinnen zu können. Es wurde deshalb versucht, durch einfachere Methoden das Kallidin zu gewinnen. Die selektive Adsorption von Kallidin an Tierkohle aus einem Serum-Inkubationsgemisch scheint diesen Anforderungen zu genügen. Zur Kohleadsorption wurde ein in der oben angegebenen Weise vorbereiteter Normalansatz nach Ablauf der maximalen Aktivierungszeit mit etwa 1/20 seines Gewichtes an Carbo aktivatus puriss. versetzt, das Gemisch unter ständigem Rühren 15 Min bei Zimmertemp. belassen und sodann zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation im Überstand vorliegende Restserum wies noch 5-10% des Gesamtkallidingehaltes sowie etwa 5 % des Gesamtkallidingehaltes auf. Das Kallidin war also zum größten Teil an die Kohle adsorbiert worden. Der Restgehalt an Kallidinogen wurde durch erneuten Zusatz von Kallikrein zu dem Restserum ebenfalls aktiviert und sodann an Kohle adsorbiert. Nach mehrmaligem Auswaschen des Kohleniederschlages mit Wasser - wodurch das an die Kohle adsorbierte Kallidin nicht eluiert wurde - wurde die Kohle mit einer 1%igen Trichloressigsäure-Methanol-Lösung aufgeschwemmt und 30-60 Min bei Zimmertemperatur belassen. Sodann wurde das

Gemisch zentrifugiert und der wasserklare Überstand dekantiert. Durch zweimalige Wiederholung dieser Methanolelution wurden 70 - 80 % des Gesamtkallidins in den Überständen zurückgewonnen. Das Trockengewicht der Lösung betrug im Durchschnitt 1,0-0,5 mg/Einheit an Kallidin. Eine weitere Reinigung und Anreicherung des in der Lösung enthaltenen Kallidins wurde durch Fällung mit der 1-3 fachen Menge an Aceton oder der 2-5 fachen Menge an Methanol erreicht. Die gewonnenen Präparate erwiesen sich jedoch nur sehr wenig beständig, so daß von ihnen als Ausgangsbasis für weitere Reinigung Abstand genommen wurde.

Eine dritte Methode, die zur Anreicherung von Kallidin Verwendung fand, war die Fraktionierung eines Kallidinogen Kallikrein Inkubationsgemisches an Ionenaustauschsäulen. Säulen mit Aluminiumoxyd (nach Brockmann) führten infolge ihrer nur geringen Adsorptionsfähigkeit gegenüber Kallidin zu keiner wesentlichen Auftrennung und damit auch Reinigung der im Inkubationsgemisch vorhandenen Komponenten. Die in Fraktionen von 10-20 ml aufgefangenen Eluate wiesen kein charakteristisches Aktivitätsoptimum bei bestimmten Fraktionen auf, sondern waren mehr oder weniger stark ausgeprägt über das gesamte Elutionsspektrum verteilt. Es war deshalb notwendig zur Anreicherung von Kallidin Austauscher zu verwenden mit hohem Adsorptionsvermögen. Der Kationenaustauscher Amberlite IR4-B führte ähnlich wie das Aluminiumoxyd nicht oder nur wenig zur Adsorption des Kallidins, doch war damit eine weitgehende Abtrennung von Begleitsubstanzen zu erreichen. Die Elutionsflüssigkeit war bei breitem Aktivitätsspektrum wasserklar und durchsichtig. Es ist jedoch anzunehmen, daß nicht die gesamte Aktivität der Eluate auf Kallidin zurückzuführen ist sondern z.T. auch auf andere, bisher nicht näher identifizierte darmaktive Substanzen des Serums. Eine weitere Auftrennung der gewonnenen Eluate in einer Amberlite IRC-50Säule führte zu einer scharfen Aufteilung in zwei Aktivitätsoptima. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei um verschiedene Substanzen handelt. Sofortige Fraktionierung eines Inkubationsgemisches an einer Amberlite IRC-50 Säule hatte eine scharfe Abtrennung der darmaktiven Substanzen zur Folge. In

einem Ansatz von 150 ml, in der 56 Einzelfractionen von je 10 ml eluiert wurden, wiesen die Fractionen 5-14 einen deutlich ausgeprägten Aktivitätsgipfel auf.

Da es denkbar wäre, daß diese offenbar voneinander verschiedenen darmaktiven Substanzen nicht allein durch den Zusatz von Kallikrein im Plasma aktiviert worden waren, sondern daß auch andere Reaktionen dabei eine Rolle gespielt hatten, wurde untersucht, inwieweit eine Aktivierung von darmaktiven Substanzen im Serum durch nicht enzymatisch wirksame Verbindungen zustande kommt.

Versetzt man Serum oder Plasma mit starken Säuren oder Laugen (H_2SO_4 , HCl oder NaOH) und erhitzt das Gemisch entweder über offener Flamme oder im Wasserbad, oder auch durch Einleiten von Wasserdampf etwa 5 Min. lang, so kommt es in jedem Fall zur Freisetzung von Substanzen, die den isolierten Meerschweinchendarm ähnlich wie Kallidin, Bradykinin oder Histamin zur Kontraktion zu erregen vermögen. Auch eine Denaturierung von Plasma durch Hitze allein - sei es durch Einleiten von Wasserdampf oder auch Belassen des Plasmas im Thermostaten bei 90 Grad etwa 5-10 Min. lang - hat eine Freisetzung darmaktiver Substanzen in dem Serum zur Folge. In ähnlicher Weise ist auch nach Versetzen von Serum oder Plasma mit organischen Lösungsmitteln wie abs. Äthanol oder Aceton in der 1-10fachen Volumenmenge mit oder ohne Erhitzen in dem Serumgemisch eine Freisetzung von darmaktiven Substanzen zu beobachten. Am Blutdruck eines narkotisierten Hundes sind diese Substanzen ohne sichere Wirkung. Seltsamerweise werden durch jedes der genannten Verfahren Substanzen aktiviert, die in ihren chemischen und z.T. auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften nicht identisch sind.

Es wäre naheliegend, das Freiwerden der genannten darmaktiven Substanzen als rein physikalischen Vorgang in einer einfachen Abspaltung von Verbindungen aus dem Verband des Serums zu sehen, die zufällig auch darmerregende Eigenschaften aufweisen. Daß die Verhältnisse jedoch nicht so einfach liegen, geht daraus hervor, daß die nach den Denaturierungsprozessen erhaltenen darmaktiven Lösungen in ihrer darmerregenden Wirkung

nicht konstant bleiben, sondern je nach der seit dem Denaturierungsprozeß verstrichenen Zeitspanne eine mehr oder weniger hohe Aktivität aufweisen. In den gewonnenen Lösungen müssen also Substanzen vorhanden sein, die einerseits eine Vermehrung der darmaktiven Wirkung herbeizuführen vermögen und andererseits auch Substanzen, die eine Inaktivierung dieser darmaktiven Verbindungen bewirken. Das tatsächliche Vorhandensein derartiger Substanzen wurde dadurch nachgewiesen, daß z.B. bei Inkubation eines nach der Äthanol+Hitze Behandlung gewonnenen Überstandes - der selbst keine darmerregende Wirkung besitzt - mit frischem Rinderplasma oder auch mit einem nach der Denaturierung verbliebenem Niederschlag eine bedeutende Freisetzung darmaktiver Substanzen in dem Inkubationsgemisch zu beobachten ist. Diese Freisetzung verläuft ähnlich wie z.B. bei Inkubation von Rinderplasma mit einer enzymatisch wirksamen Substanz, etwa Kallikrein oder Trypsin und anderen. Es ist also anzunehmen, daß durch die genannten Denaturierungsprozesse in dem Serum zunächst Substanzen freigesetzt werden, die als Aktivatoren von Enzymen wirken, die ihrerseits zur Freilegung von darmaktiven Substanzen im Serum führen. Der genannte Reaktionsweg wurde für die durch Methanolzusatz sowie für die durch Hitze + H_2SO_4 denaturierten Serumgemische in einer schematischen Skizze dargestellt.

**Verzeichnis der in dieser Arbeit angeführten und benützten
Literatur:**

- 1) E. K. Frey, H. Kraut und E. Werle "Kallekrein" (Padutin)
Ferdinand Enke Verlag (1950).
- 2) E. K. Frey, W. Hartenbach, F. Schultz.
Depot-Padutin und seine therapeutische Verwendbarkeit.
Münchener Med. Wchschr. (1953) 95, 1, 11 - 15.
- 3) Werle und Pereck. Dissertationsarbeit (1948)
Zur Kenntnis der Kreislaufsubstanz Kallidin.
- 4) Hilton and Lewis. The Relationship between glandular activity, Bradykinn formation and functional vasodilatation in the submandibular salivary gland.
Brit. Journ. of Physiol. (1956) 134, 2, 471 - 483.
- 5) E. Werle und F. Preisser Zur Frage der Identität von Kallidinogen und Bradykinnogen. Klin. Wchschr. (1956) 34, 37/38, 10
- 6) E. Werle und F. Preisser. Entstehung von zwei die glatte Muskulatur erregenden Substanzen in Milch.
Die Naturwissenschaften (1956) 43, 16, 376.
- 7) Robert C. Millonig. Isolation of an Aminopeptidase Type B from Clostridium Botulinum.
Journ. of Bacteriologie (1956) 72, 3, 301 - 307.
- 8) Desiree Armstrong, J. B. Pepson, C. A. Keele and J. W. Stewart
Journ. of Physiologie (1957) 135, 2, 350.
- 9) D. J. Holdstock, A. P. Mathias und M. Schachter.
Brit. Journ. of Pharmakologie and Chemotherapie (1957) 12,2,

Fritz Preisser

München, den 5. Sept. 1957.

München 19

Volkartstr. 70

Mein Lebenslauf.

Am 6. Januar 1931 wurde ich zu Cham/Opf. geboren. Von 1937 - 1941 besuchte ich die dortige Volksschule und trat 1941 in die Oberrealschule Cham über. 1949 absolvierte ich diese Schule mit der Reifeprüfung und begann im Mai 1950 das medizinische Studium an der damaligen Aussenstelle der medizinischen Fakultät der Universität München in Regensburg. Nach 5 Semestern, im SS 1952, beendete ich mein Studium in Regensburg mit dem Physikum und wechselte im WS 1952/53 an die Universität München über. 1956 schloß ich mein medizinisches Studium in München mit dem Staatsexamen ab. Seit Oktober 1956 arbeite ich im Laboratorium der Chir. Univ. Klinik München als wissenschaftlicher Mitarbeiter.

